

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE RIZOBIOS QUE NODULAN *CICER CANARIENSE* EN EL PARQUE NACIONAL DE LA CALDERA DE TABURIENTE Y SU EVALUACIÓN COMO BIOFERTILIZANTES

MILAGROS LEÓN BARRIOS<sup>1</sup>, JUAN PÉREZ YÉPEZ<sup>1</sup>, PILAR MARTÍNEZ HIDALGO<sup>2</sup>,  
VÍCTOR GARZÓN MACHADO<sup>3</sup>, RICARDO PÉREZ GALDONA<sup>1</sup>,  
MARCELINO DEL ARCO AGUILAR<sup>3</sup>, EUSTOQUIO MARTÍNEZ-MOLINA<sup>2</sup>  
Y ENCARNA VELÁZQUEZ<sup>3</sup>

## RESUMEN

*Cicer canariense* es un endemismo de La Palma y Tenerife (Islas Canarias). La caracterización de las bacterias que nodulan esta leguminosa en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente y dos localidades en el entorno noroeste y sur del Parque indica que *C. canariense* es una leguminosa promiscua nodulada por rizobios genética y filogenéticamente muy diversos. Estos rizobios pertenecen a nueve grupos genómicos que representan distintas especies o genospecies del género *Mesorhizobium*. Algunos grupos presentan una amplia distribución dentro y fuera del Parque, mientras otras se detectaron exclusiva o predominantemente en una localidad. Las genospecies denominadas *M. tianshanense-subgrupo*, y *M. caraganae-I* y *M. caraganae-II* fueron las mayoritarias y representan nuevas especies para el género. Algunos genotipos minoritarios son también nuevas especies. Asociados a estos mesorizobios se encontraron tres linajes distantes de genes simbióticos que representan diferentes simbiovars (sv): sv. loti (característico de rizobios que nodulan *Lotus* spp.), sv. ciceri (característico de los rizobios de *C. arietinum*) y un simbiovar nuevo específico de *C. canariense*. Curiosamente, el sv. loti es el más ampliamente distribuido entre las genospecies de rizobios que nodulan *C. canariense*. La evaluación de la eficacia simbiótica con cepas de distinto fondo cromosómico (distintas genospecies) y diferente simbiovar muestra gran variabilidad en el desarrollo de las plantas. En general, las cepas del sv. loti producen el mejor desarrollo de las plantas, aunque la eficacia varía dependiendo del fondo cromosómico. Las cepas de la especie *Mesorhizobium tamadayense* y el sv. loti fueron las más eficaces.

**Palabras Claves:** *Cicer canariense*, rizobios, diversidad genética, biofertilizantes

1 Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

2 Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, 37007. Salamanca.

3 Departamento de Biología Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Universidad de La Laguna. 38200 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

mileonba@ull.es; jperezye@ull.es; pmh@usal.es; vigarma@ull.es; rperezga@ull.es; marco@ull.es; emm@usal.es; evp@usal.es

# GENETIC DIVERSITY OF RHIZOBIA NODULATING CICER CANARIENSE IN CALDERA DE TABURIENTE NATIONAL PARK AND THEIR EVALUATION AS BIOFERTILIZERS

## SUMMARY

*Cicer canariense* is endemic to La Palma and Tenerife islands. Characterization of the bacteria nodulating this legume in soils of Caldera de Taburiente National Park and two locations in the northwest and south of the Park showed that *C. canariense* is a promiscuous legume nodulated by rhizobia genetic and phylogenetically diverse. These rhizobia belong to nine genomic groups which correspond to species or genospecies of genus *Mesorhizobium*. Some species have a wide area of distribution inside and outside the Park, while others were detected exclusively or predominantly in one location. The genospecies called *M. tianshanense*-subgroup, and *M. caraganae*-I and *M. caraganae*-II were majority and they could constitute new species of the genus. Some minority lineages are also new species. It was found associated with these mesorhizobia three distant symbiotic lineages, representing different symbiovars (sv.): sv. loti (characteristic of the Lotus-rhizobia.), sv. ciceri (characteristic of *C. arietinum* rhizobia) and a novel symbiovar specific to *C. canariense*. The sv. loti is the most widely distributed among the rhizobial genospecies nodulating *C. canariense*. The evaluation of the symbiotic effectiveness with strains from different chromosomal background (different genospecies) and symbiovars showed large variability in the plant development. In general, sv. loti strains produced the best growth of plants, although the efficacy varied depending on the chromosomal background. *Mesorhizobium tamadayense* sv. loti strains were the most effective.

**Key words:** *Cicer canariense*, rhizobia, genetic diversity, biofertilizers,

## INTRODUCCIÓN

### El suelo como fuente de microorganismos beneficiosos para las plantas

El suelo, es una matriz viva que alberga gran parte de la diversidad microbiana del Planeta. Un solo gramo de suelo puede contener hasta  $10^{10}$  microorganismos (TORSVIK *et al.* 1996) y se estima que tan solo un 1% de esos microorganismos pueden ser cultivados en medios artificiales y caracterizados. Este hecho implica, que la mayor parte de la microbiota de los ecosistemas edáficos sigue aun siendo una incógnita. Es la presencia de microorganismos y la interacción de los mismos entre sí y con elementos del suelo los responsables de procesos tan importantes como el mantenimiento de la vida vegetal. Aunque algunos microorganismos que viven en el suelo son patógenos, muchos otros

son beneficiosos para el desarrollo de las plantas. Uno de los ejemplos más claros y conocidos son los hongos micorrícicos que participan activamente en la nutrición mineral de las plantas (SIMARD & DURALL 2004). Pero además, el suelo contiene un alto número de bacterias beneficiosas para el crecimiento vegetal que viven en íntimo contacto con la rizosfera de la planta y se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (LUGTENBERG & KAMILOVA 2009). Estas bacterias, por diversos mecanismos, directos o indirectos, estimulan el crecimiento vegetal. Algunas bacterias rizosféricas mejoran indirectamente el crecimiento de las plantas al producir moléculas que inhiben el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (ESSALMANI & LAHLOU 2003). Actividades de enzimas bacterianas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato

desaminasa (ACCd), capaz de disminuir en el tejido vegetal los niveles perjudiciales de etileno ayudan a las plantas a aliviar estreses bióticos y abióticos (GLICK 2005; GLICK *et al.* 2007). Otras bacterias en la rizosfera estimulan directamente el crecimiento vegetal al sintetizar fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) (ASGHAR *et al.* 2002; CHAINHARN & LUMYONG 2011), o bien mejoran el estado nutricional de la planta (CARSON *et al.* 2000) favoreciendo la captación de nutrientes esenciales como el fósforo (RICHARDSON *et al.* 2009; PATEL *et al.* 2010), el hierro (LUGTENBERG & KAMILOVA 2009) o el nitrógeno (MASSON-BOIVIN *et al.* 2009).

Una de las interacciones más estudiadas y mejor conocidas es aquella que ocurre entre un conjunto de bacterias del suelo, conocidas como “rizobios”, y las raíces de las plantas leguminosas. Esta interacción culmina en una endosimbiosis en la que los rizobios desencadenan la formación de nódulos radicales donde estas bacterias son capaces de fijar el dinitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), es decir, reducirlo hasta amonio, que luego es transportado hasta la planta haciéndola, por tanto, independiente de aporte externo de nitrógeno. La importancia de esta simbiosis queda constatada por el hecho de que el nitrógeno es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo vegetal. Merece la pena señalar que aunque la fijación biológica del nitrógeno (FBN) puede ser llevada a cabo por bacterias en vida libre, la realizada por los rizobios en simbiosis con leguminosas es la principal entrada de nitrógeno a los ecosistemas. Se estima que del total de las aproximadamente 275 millones de toneladas de nitrógeno fijado globalmente al año (considerando FBN, fijación abiótica e industrial), la FBN genera 175 millones de toneladas, y de ellas, un 65 % proviene de la simbiosis de los rizobios con las leguminosas (CANFIELD *et al.* 2010).

### La leguminosa: *Cicer canariense*

*Cicer canariense* (SANTOS & LEWIS, 1985) es una especie de garbanzo salvaje (“la garbancera canaria”) endémico de las islas Canarias. Aunque se han detectado pequeñas poblaciones de *C. canariense* en dos localidades de Tenerife (SANTOS & LEWIS 1985; HERNÁNDEZ 1996), la mayoría y

más numerosas se encuentran en La Palma (SANTOS & LEWIS 1985). Las poblaciones de esta leguminosa se localizan en el piso bioclimático mesocanario seco, característico de los bosques de pino canario (*Pinus canariensis*), aunque en esta franja tiende a buscar las áreas más húmedas. Dentro del Parque de La Caldera de Taburiente, las poblaciones naturales que se han datado ocupan regiones cercanas a pequeños arroyos, entre los 500 y 1450 metros de altitud (SANTOS & LEWIS 1985). En el sotobosque del pinar, *C. canariense* comparte el hábitat con otras plantas que incluyen otras leguminosas como *Adenocarpus viscosus*, *Chamaecytisus proliferus ssp. palmensis* y *calderae* o *Lotus campylocladus ssp. hillebrandii*, posiblemente la especie acompañante más abundante. Esta leguminosa perenne es la única especie del género *Cicer* en las Islas. Las poblaciones naturales de *C. canariense* están muy fragmentadas y contienen un bajo número de individuos, una situación por la cual ha sido catalogada como “en peligro” en la Lista Roja de la Flora Vascular Española” (MORENO, J.C. 2008). Aunque más recientemente, el Gobierno de Canarias rebajó el grado de amenaza a “Especie de interés para los ecosistemas canarios” (Ley 4/2010, de 4 de junio, Catálogo de especies protegidas, BOC 112, 2010), sin embargo, en el “Catálogo español de especies amenazadas” (R.D. 139/2011, de 4 de febrero, BOE, 2011) está recogida como especie “vulnerable”. Los herbívoros (conejos, cabras y arruís) han sido probablemente la amenaza más importante que han tenido las poblaciones de *C. canariense* (GARZÓN-MACHADO *et al.* 2010).

### El microsimbionte: los rizobios

Rizobio es el término general que se usa para designar a las bacterias que establecen la simbiosis fijadora de nitrógeno con las leguminosas. Bajo este término, sin embargo, se engloba actualmente a una gran variedad de bacterias gramnegativas que pertenecen a distintos géneros que se distribuyen en varias familias. A pesar de ser las leguminosas una de las familias más numerosas de plantas, con casi 20.000 especies, hasta hace unos años sólo unas pocas, principalmente las de interés agrícola, habían sido estudiadas respecto a sus rizobios simbiosis. En las últimas décadas

estos estudios se han ampliado a un gran número de especies y de regiones geográficas. Este hecho, conjuntamente con el uso de técnicas moleculares, ha revelado la existencia de una enorme diversidad rizobiana y ha permitido la descripción de nuevas especies y géneros de rizobios, conduciendo a profundos cambios en su taxonomía. Actualmente existen unas 100 especies de rizobios en cinco géneros, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (BERRADA & FRIKRI-BENBRAHIM 2014) perteneciente a cuatro familias diferentes de Alphaproteobacterias (GARRITY 2001): *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Hyphomicrobiaceae*. Estas nuevas Familias tienen la particularidad de incluir junto con los rizobios a otras bacterias no fijadoras de nitrógeno. Uno de los hechos más sorprendente en los últimos años ha sido el aislamiento a partir de nódulos radicales de leguminosas de bacterias simbióticas con características muy diferentes a los géneros “clásicos” de rizobios antes mencionados. Estos “nuevos rizobios” pertenecen a géneros que no sólo se encuadran en otras ramas de  $\alpha$ -Proteobacteria (*Methylobacterium*; *Blastobacter*; *Ochrobactrum*, *Microvirga*, etc) (JOURAND *et al.* 2004; ARDLEY *et al.* 2012) sino, aún menos esperado, dentro de las Betaproteobacteria (*Burkholderia*, *Ralstonia*, etc) (MOULIN *et al.* 2001; GYANESHWAR *et al.* 2011).

Una taxonomía polifásica, que combina datos morfológicos, fisiológicos, genéticos y filogénicos, ha sido la responsable de esta nueva clasificación, aunque sin duda, los datos derivados del análisis filogenético de secuencias del genoma han sido los más relevantes. La secuenciación del gen que codifica el ARN ribosómico 16S supuso una revolución en taxonomía bacteriana y continua siendo uno de los mínimos estándares para la designación de especies en los procariontes. Por ello, ha sido común establecer clasificaciones de procariontes basándose únicamente en el análisis de este único gen, una práctica que tiene sus problemas. Uno de los principales inconvenientes es que al tratarse de secuencias muy conservadas no permite discriminar entre especies próximas. Además, en algunos procariontes, incluidos los rizobios, se ha demostrado la existencia de recombinación en este gen debido a fenómeno de trans-

ferencia horizontal, lo que distorsiona las relaciones filogenéticas. Por todo ello, no es adecuado describir especies sobre la base de un solo gen sino que se hace necesario contrastarlo con otros genes de copia única que se localicen en diferentes posiciones en el cromosoma bacteriano. Durante la última década, el esquema evolutivo derivado de los genes ribosómicos se ha contrastado con el de secuencias de genes codificadores de proteínas esenciales implicadas en procesos como la multiplicación y metabolismo celular (*recA*, *atpD*, *dnaK*, *glnIII*, *gyrB* o *rpoB*) denominados genes ‘housekeeping’. Estos genes, que tienen una tasa de evolución mayor que el ADNr 16S, producen filogenias altamente resueltas que permite una mejor delineación de las especies (GAUNT *et al.* 2001; VINUESA *et al.* 2005; MARTENS *et al.* 2008). En los últimos años, la descripción de nuevas especies se apoya en los datos de estas secuencias, usadas bien en filogenias de genes individuales o principalmente, construyendo filogenias basadas en la concatenación de secuencias de varios genes, una técnica conocida como multilocus sequence analysis (MLSA) que tiene un gran poder para discriminar las distintas especies dentro de un género (VINUESA *et al.* 2005; MARTENS *et al.* 2008; RAMIREZ-BAHENA *et al.* 2012). Estos genes tampoco están exentos de problemas y se hace necesario elegir los mejores de acuerdo al grupo que se está analizando (RIVAS *et al.* 2009; PÉREZ-YÉPEZ *et al.* 2014).

Los rizobios como bacterias simbióticas portan además de los genes esenciales, otro grupo de genes accesorios, los genes simbióticos. Estos genes se localizan en elementos genéticos transferibles por fenómenos de transferencia horizontal, por lo que tienen una historia evolutiva diferente a los genes cromosómicos esenciales y no son útiles en taxonomía. Ahora bien, la filogenia de algunos genes de nodulación correlaciona muy bien con el rango de leguminosas hospedadoras (DOVER *et al.* 1994; HAUKKA *et al.* 1998), y por ello, especialmente *nodC*, se usan para describir los diferentes simbiotes (variantes simbióticas con un rango específico de leguminosas hospedadoras) que puedan existir dentro de una misma especie de rizobio o entre especies distintas (RIVAS *et al.* 2006; LEÓN-BARRIOS *et al.* 2009;

LORITE *et al.* 2010; ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014). Esto es de interés porque nos ayuda a prever las leguminosas que podrán ser noduladas por un genotipo simbiótico rizobiano.

### La simbiosis Cicer-rizobio.

El género *Cicer* (*Leguminosae*, *Ciceraceae*) incluye 44 especies que tienen su centro de diversidad en el suroeste asiático con algún representante en Marruecos, *C. atlanticum* (GÓMIZ 2001) y en las Islas Canarias, *C. canariense* (SANTOS & LEWIS 1986). La especie más reconocida dentro del género es *Cicer arietinum*, el garbanzo común, de gran interés comercial que se cultiva ampliamente en todo el mundo. El conocimiento de los rizobios que nodulan las especies del género *Cicer*, es escaso, y, con alguna excepción, se han centrado exclusivamente en los simbiontes del garbanzo comercial. Estos trabajos han puesto de manifiesto que las especies predominantes que nodulan *C. arietinum* pertenecen a dos especies del género *Mesorhizobium*: *M. ciceri* y *M. mediterraneum* (NOUR *et al.* 1994, NOUR *et al.* 1995). Actualmente, sin embargo, se ha descrito una mayor diversidad de especies. En suelos de la Península Ibérica se han aislado de nódulos de *C. arietinum* hasta seis especies de *Mesorhizobium*; *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. loti*, *M. amorphae*, *M. tianshanense* y *M. opportunistum* (RIVAS *et al.* 2006; ALEXANDRE *et al.* 2009; LARANJO *et al.* 2012); y en suelos alcalinos de China se ha descrito la nodulación de *C. arietinum* por *M. muleiense* (ZHANG *et al.* 2012).

Ahora bien, a pesar de toda la diversidad de especies de *Mesorhizobium* que se han descrito en los últimos años como simbiontes de *C. arietinum*, todas ellas comparten el mismo grupo de genes simbióticos, aquellos que conocemos como simbiovar *ciceri*, lo que indica que *C. arietinum* es una especie restrictiva en cuanto a sus rizobios simbiontes. A parte de los estudios de los rizobios que nodulan *C. arietinum*, prácticamente no existe información sobre los rizobios que nodulan otras especies de *Cicer*. Sólo tenemos conocimiento de un estudio (OGUTCU *et al.*, 2009) donde se ha caracterizado una colección de rizobios aislados de un garbanzo salvaje, *C. anatolicum*, una especie perenne que crece en el este de Anatolia, Turquía. Estos rizobios

fueron clasificados como *Rhizobium leguminosarum* ssp. *ciceri*. Sin embargo, esa clasificación solo se basó en perfiles genómicos (ERIC-, REP- y BOX-PCR), algo que taxonómicamente no es válido. El estudio que hemos realizado a lo largo de los tres años de este proyecto es la primera caracterización y la más exhaustiva que se ha hecho hasta la fecha de una especie de *Cicer* diferente a *C. arietinum*.

### El uso de rizobios como biofertilizantes

Como se ha expuesto, un buen número de bacterias de la microbiota del suelo ejerce un efecto beneficioso para las plantas y son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés "Plant Growth Promoting Rhizobacteria"). El uso de inoculantes de estas bacterias como biofertilizantes es una estrategia que puede ayudar a solucionar no sólo problemas de desarrollo y productividad vegetal, sino también aliviar los graves costos ambientales que supone el uso indiscriminado de fertilizantes químicos. Los rizobios son un grupo ideal de bacterias biofertilizadoras, pues como se ha comentado, son bacterias que aportan nitrógeno a las leguminosas gracias a la simbiosis fijadora de nitrógeno, pero además, más recientemente, se ha demostrado que muchas otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal, que se habían descrito originalmente en bacterias rizosféricas de vida libre, también están presente en muchos rizobios. Es bien sabido que el uso de los rizobios como biofertilizantes nitrogenados para el cultivo de leguminosas es una práctica agrícola antigua y muy extendida (ZAHNAN 2001, ALBAREDA *et al.* 2008) que ha probado ser segura, puesto que nunca se ha reportado ningún efecto negativo para las plantas, los animales o el hombre (KAMILOVA *et al.* 2015). Ahora sí, además de su uso como fertilizantes nitrogenados para leguminosas, el descubrimiento de rizobios como PGPR está haciendo de este grupo de bacterias una de las mejores opciones como biofertilizantes, tanto de leguminosas como de plantas no leguminosas, (YANNI *et al.* 2001, GARCÍA-FRAILE *et al.* 2012) por carecer de potencial patogénico, frente a otras PGPR que si lo tienen (EBERL & TÜMMLER 2004). En la investigación que ocupa este proyecto, la inoculación con biofertilizantes basados en inoculantes rizobianos podría ayudar a mejorar el grado de desarrollo de especies vegetales amenazadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestreo y aislamiento de rizobios

Los rizobios se aislaron en diez localidades donde existen poblaciones de *Cicer canariense*: seis en poblaciones naturales o plantaciones reforzadas situadas dentro del Parque Nacional de La Caldera de Taburiente y cuatro poblaciones, todas naturales, situadas al noroeste y sur del Parque. Las zonas de muestreo dentro del Parque fueron: Mirador de las Chozas (28R220323/3177809, 1280 m s.m.), Roque de los Cuervos (28R220530/3177444, 1480 m s.m.), Fuente de la Mula (28R217896/3180655, 650 m s.m.), Risco Liso (28R218196/3181403, 1020 m s.m.), Riachuelo (28R221606/3177050, 1110 m s.m.), y Bejenado sur (28R0220744/3176348, 1288 m s.m.). Fuera del Parque las siguientes cuatro áreas: Barranco de los Hombres (28R219475/3165577, 911 m s.m.), Barranco de Briestas (28R214671/3186655, 1375 m s.m.), Barranco de Donarjito (28R213842/3187105, 1186 m s.m.) y Barranco de Izcagua (28R211180/3186279, 798 m s.m.). Estas últimas cuatro localidades fueron incluidas porque representan áreas óptimas para el crecimiento de *C. canariense* (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014). Para la detección de estas áreas óptimas se diseñó un mapa corológico de *C. canariense* (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014) a partir de las coordenadas de las localidades donde se conocen poblaciones naturales y de las características geográficas y ecológicas de las mismas. Para el aislamiento de los rizobios, se usaron semillas de *C. canariense* (cedidas por el Parque), que esterilizadas (con hipoclorito sódico comercial al 50%) y germinadas, fueron usadas como “plantas-trampa” en los suelos de cada una de las diez localidades. Las semillas, debido a la dureza de su cubierta, necesitaron de un paso de escarificación de 120 min en ácido sulfúrico concentrado (GUMA *et al.* 2010) que favorece la hidratación y posterior germinación. Los rizobios se aislaron ocho semanas después a partir de los nódulos radicales (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014). Los cultivos puros de las bacterias fueron conservados a -80°C en YM (VINCENT 1970) con 20% de glice-

rol (v/v). La capacidad de las bacterias aisladas para infectar a su hospedador original, *C. canariense*, se verificó inoculándolas sobre semillas germinadas estériles (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014) y observando la aparición de nódulos radicales.

### Caracterización genética y filogenética

- **Extracción y cuantificación de ADN genómico.** El ADN genómico se extrajo de cultivos bacterianos bien crecidos, haciendo uso del kit comercial AquaPure Genomic DNA isolation Kit (Bio-Rad). La cuantificación del ADN extraído se realizó en geles de agarosa al 1% comparándolo con el marcador de peso molecular lambda-DNA *Hind*III o mediante el uso de NanoDrop 1000 spectrophotometer.
- **Estimación de la diversidad genética de las cepas aisladas por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) fingerprint.** Se usó la técnica M13-RAPD-PCR para obtener una huella molecular de cada uno de los aislados siguiendo un protocolo descrito previamente (RAMIREZ-BAHENA *et al.* 2012).
- **Amplificación del gen ARNr 16S y polimorfismo de perfiles de fragmentos de restricción (16S-RFLP).** El gen que codifica para el ARNr 16S (*rrs*), se amplificó mediante el uso de cebadores universales (WEISBURG *et al.* 1991). Los amplificadores resultantes de cada una de las cepas fueron sometidos a una digestión individual con tres endonucleasas, *Hinf*I, *Msp*I y *Rsa*I, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los perfiles de restricción, fueron combinados y analizados como se ha descrito (JARABO-LORENZO *et al.* 2000).
- **Secuenciación y Análisis filogenético.** De cada grupo 16S-RFLP se eligieron cepas representativas para determinar las secuencias casi completas del gen *rrs* (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014). Además, se amplificaron y secuenciaron fragmentos parciales de otros siete genes codificadores de proteínas, *recA* (homologous recombination protein A), *glnII*

(glutamine synthetase II), *dnaK* (chaperone protein DnaK), *gyrB* (DNA gyrase B protein sub-unit), *rpoB* (RNA polymerase beta subunit), *truA* (tRNA pseudouridine synthase) y *thrA* (threonine biosynthesis gene A) siguiendo la metodología previamente descrita (PÉREZ-YÉPEZ *et al.* 2014). El alineamiento de las secuencias se realizó usando la herramienta CLUSTAL W del software MEGA v5.2 (TAMURA *et al.* 2012) y los árboles filogenéticos se construyeron usando los algoritmos de Neighbour-Joining (NJ) y Maximum Likelihood (ML) como se ha descrito en (PÉREZ-YÉPEZ *et al.* 2014).

### Caracterización simbiótica: genes y fenotipos simbióticos

- **Filogenia de los genes de nodulación y de fijación.** Una representación de cepas pertenecientes a distintos grupos genómicos se seleccionaron para estudiar la filogenia de los genes simbióticos y establecer variantes simbióticas o simbiovars. Los genes simbióticos elegidos para secuenciación fueron los genes de nodulación *nodC* y *nodA* y el gen de fijación *nifH*. Los primers y protocolos seguidos se describen en ARMAS-CAPOTE *et al.* (2014) y MARTINEZ-HIDALGO *et al.* (2016).
- **Evaluación de las propiedades simbióticas: Nodulación y eficacia simbiótica.** De cada uno de los linajes simbióticos, se eligieron representantes para evaluar los fenotipos simbióticos, a fin de seleccionar las cepas de rizobios de mayor eficacia simbiótica que pudieran ser utilizadas como inoculantes en futuros ensayos. La eficacia simbiótica se calculó según GIBSON, 1987. Para ello, las plantas inoculadas con los rizobios se compararon con controles negativos (sin bacteria y sin nitrógeno) y con controles positivos (sin bacteria y con aporte de nitrógeno exógeno, KNO<sub>3</sub> 0,4 g/l). El contenido en nitrógeno de las plantas se midió por espectrometría mediante un autoanalizador de flujo (servicio de análisis del IRNASA-CSIC, Salamanca). Los detalles de la metodología se recogen en MARTINEZ-HIDALGO *et al.* (2015).

### Evaluación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal

- **Detección de rizobios con 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa).** La secuenciación y análisis filogenético del gen *acdS*, que codifica para la ACCd, se realizó siguiendo protocolos ya descritos (NASCIMENTO *et al.* 2012). Para comprobar si la expresión de esta enzima es dependiente de vida simbiótica o se expresa también en vida libre, se ensayó su capacidad para crecer en un medio mínimo con ACC (1,5 mM) como única fuente de nitrógeno, comparándolo con un control positivo (con nitrato amónico) y un control negativo (ausencia de fuente de nitrógeno).
- **Detección de rizobios solubilizadores de fosfatos.** Se ensayó la capacidad de los rizobios para solubilizar una fuente de fosfato insoluble. Para ello, los rizobios seleccionados se crecieron durante 10-14 días a 28°C en el medio NBRIP (SHEKHAR *et al.* 1999) con fosfato tricálcico como fuente de fósforo. La solubilización de fosfato se pone de manifiesto por la generación de un halo transparente alrededor de la colonia. La eficiencia de solubilización se calcula midiendo los diámetros de las colonias y de los halos obtenidos (SRIVASTAVA *et al.* 2004).
- **Detección de rizobios productores de ácido indol-3-acético (AIA).** La producción de AIA se evaluó en sobrenadantes de cultivos por medio del método colorimétrico de Gordon-Weber (GORDON-WEBER 1951) con el reactivo de Salkowski. La cantidad de AIA producida por los rizobios se calculó a partir de una recta de calibrado con concentraciones conocidas de AIA.
- **Detección de rizobios productores de sideróforos.** La capacidad de los rizobios para sintetizar sideróforos se ensayó mediante la técnica de difusión en medio de agar con CAS (Cromo Azurol S) (ALEXANDER *et al.* 1991). En este medio, las cepas productoras presentan un halo amarillo alrededor de las colonias (SCHYWN *et al.* 1987).

## RESULTADOS

### Localidades y aislamiento de rizobios

Se aislaron un total de 113 cepas de rizobios (Tabla 1). Puesto que el objetivo principal de este estudio era caracterizar los rizobios asociados a las poblaciones de *C. canariense* que crecen en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente, la mayoría de las bacterias (83 cepas) se aislaron de seis poblaciones del Parque, que incluyen tres poblaciones naturales, en Bejenado, Fuente de la Mula y Roque de los Cuervos, y tres plantaciones en el Mirador de las Chozas, Risco Liso Alto y el Riachuelo. El mayor número de aislados se obtuvo en el Mirador de las Chozas, donde la abundancia de plántulas alrededor de la parcela plantada permitió la recolección directa de nódulos radicales (Tabla 1). A pesar de que en la parcela de Risco Liso Alto también se encontró un buen número de plántulas, ninguna de ellas estaba nodulada, y, se obtuvo un solo nódulo en las plantas-trampa plantadas en este suelo. Aunque desconocemos las razones de la aparente ausencia de rizobios compatibles en esta localidad, este resultado podría explicarse por el contenido alto en nitrógeno detectado en suelos de esta parcelas (GARZÓN-MACHADO, 2012), lo cual, junto con la gruesa capa (unos 25 cm de profundidad) de pinocha en descomposición, en la que se desarrollan abundantes hongos, podría impedir el crecimiento de los rizobios o inhibir el proceso de nodulación.

Un mapa de modelización (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014) construido para detectar las zonas óptimas para el crecimiento de *C. canariense* en la isla de La Palma, mostró que los parámetros de altitud, tipo de suelo, media anual de precipitación y temperatura, fueron los más significativos para explicar la idoneidad de los hábitats, y por tanto la distribución de *C. canariense*. El modelo mostró que las poblaciones en la zona sur del Parque, principalmente el Riachuelo, pero también Mirador de las Chozas, Roque de los Cuervos y Bejenado, son óptimas para el crecimiento de *C. canariense*.

### Diversidad genética de los rizobios: 16S-RFLP y M13-RAPD

Los perfiles de 16S-RFLP distinguieron nueve ribotipos que en un UPGMA dendrograma se distribuyen en varias ramas con distintas especies del género *Mesorhizobium* (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014), indicando la existencia de una alta diversidad genética y sugiere la existencia de diferentes especies. Cinco ribotipos mayoritarios (más de 10 aislados) se agruparon con, o se situaron próximos, a las cepas tipo de las especies *M. caraganae* (32 cepas), *M. tianshanense*/*M. gobiense*/*M. metallidurans* (29 cepas), *M. opportunistum* (14 cepas), *M. ciceri* (12 cepas) y *M. tamadayense* (11 cepas). Los cuatro ribotipos minoritarios (3-5 cepas) se agruparon con las especies *M. australicum* (5 cepas), *M. huakuui*/*M. amorphae* (3 cepas), *M. loti* (4 cepas) y una subrama próxima *M. loti* (3 cepas). La distribución de estos ribotipos en las localidades de muestreo mostró que algunos están restringidos o predominan en una localidad, mientras otros están ampliamente distribuidos y se encuentran dentro y fuera del Parque. Por ejemplo, el ribotipo *M. tamadayense* sólo se detectó en una localidad fuera del Parque (Bco. de Briestas), y por el contrario, los aislados del ribotipo *M. opportunistum* y *M. caraganae* se encontraron ampliamente distribuidos en localidades dentro y fuera del Parque.

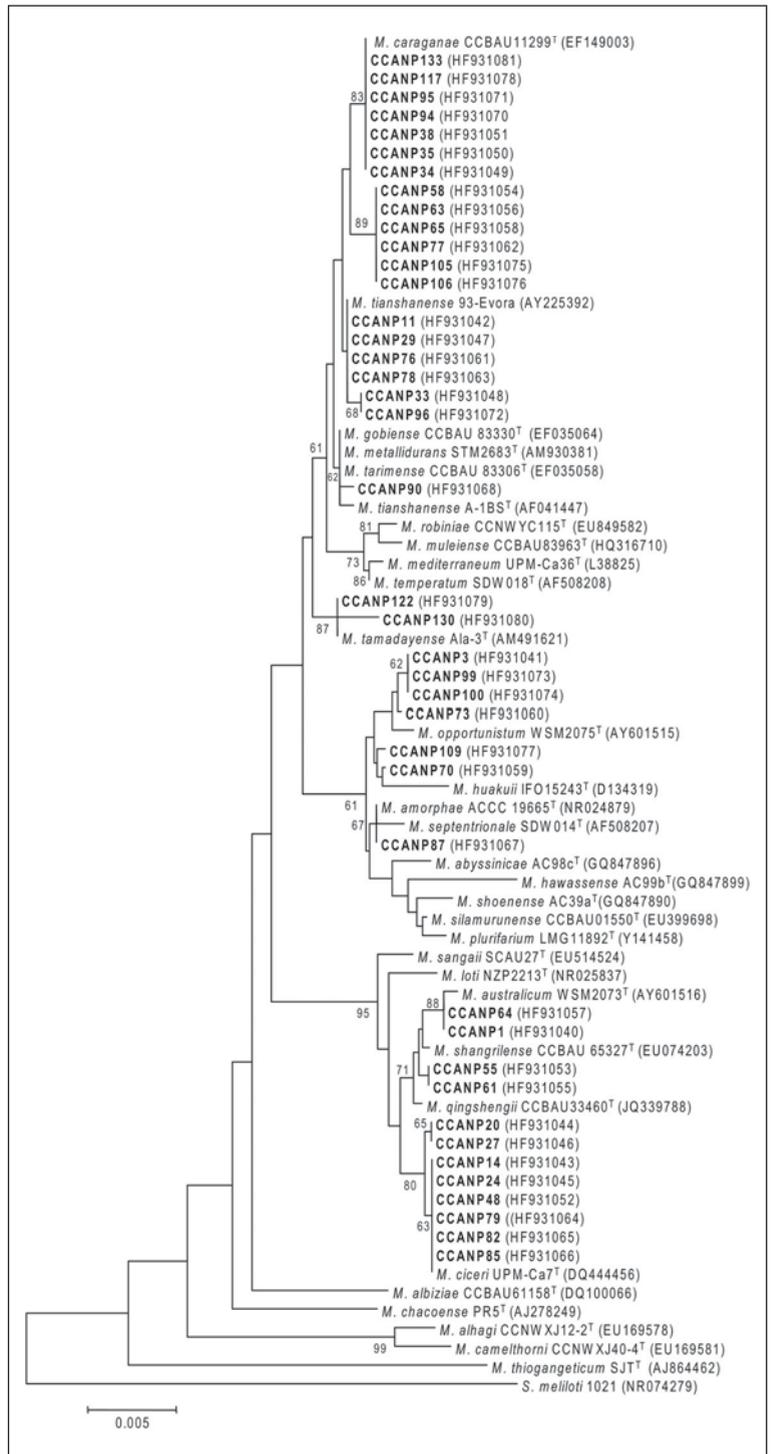
Los perfiles RAPDs, mostraron una alta diversidad genética a nivel intraespecífico de los aislados (ARMAS-CAPOTE *et al.* 2014), es decir, la mayoría de los aislamientos se correspondían con cepas distintas. La menor diversidad genética se encontró dentro del ribotipo *M. ciceri*, en el que 4 de las 12 cepas fueron redundantes.

### Análisis filogenético de genes esenciales y taxonomía

Para deducir las relaciones filogenéticas de los rizobios de *C. canariense* con todas las especies del *Mesorhizobium* actualmente reconocidas, se eligieron cepas representativas de los distintos grupos 16S-RFLP y se secuenciaron y compararon con las secuencias depositadas en el Genbank de todas las cepas tipo de las especies del género.

**Figura 1.** Árbol filogenético basado en un fragmento de 1308 nt del gen 16S ADNr de los aislados de *Cicer canariense* (en negrita) y cepas tipo de *Mesorhizobium*. Los números de acceso son dados en paréntesis. Los números de los nodos son valores de bootstrap ( $\geq 50\%$ ) para 500 pseudoréplicas. Se usó el método Maximum Likelihood (Jukes-Cantor con gamma distribuciones y sitios invariables) para la reconstrucción del árbol. La escala indica el número de sustituciones por sitio. (Tomado de Armas-Capote et al. 2014)

**Figure 1.** Maximum Likelihood (Jukes-Cantor model with gamma distribution and invariant sites) phylogenetic tree base on 16s rRNA gene sequences (1308nt) of *Cicer canariense* isolates and type strains of *Mesorhizobium*. Accession numbers are given in parentheses. Numbers at the nodes are bootstrap support values ( $\geq 50\%$ ) for 500 pseudoreplicas. The scale bar indicates the number of substitutions per site. (Taken from Armas-Capote et al. 2014)



| Cepa    | Localidad <sup>a</sup> | Grupo 16S RFLP <sup>b</sup> | Filogenia ADNr16S (especie más próxima) | Número de acceso | Simbiotipo (gen nodC) | Número de acceso |
|---------|------------------------|-----------------------------|---|------------------|-----------------------|------------------|
| CCANP1  | MdC (d)                | <i>Maus</i>                 | <i>M. australicum</i>                   | HF931040         | loti                  | HF933967         |
| CCANP2  | MdC (d)                | <i>Mopp</i>                 |   |                  |                       |                  |
| CCANP3  | MdC (d)                | <i>Mopp</i>                 | <i>M. opportunistum</i>                 | HF931041         | new                   | HF933968         |
| CCANP5  | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  | loti                  | HF933969         |
| CCANP7  | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP8  | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP9  | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  | loti                  | HF933970         |
| CCANP10 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP11 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                | <i>M. tianshan-sGr</i>                  | HF931042         | loti                  | HF933971         |
| CCANP12 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  | loti                  |                  |
| CCANP13 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  | loti                  | HF933972         |
| CCANP14 | MdC (d)                | <i>Mci</i>                  | <i>M. ciceri</i>                        | HF931043         | loti                  | HF933973         |
| CCANP15 | MdC (d)                | <i>Mci</i>                  |   |                  |                       |                  |
| CCANP16 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP17 | MdC (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II<sup>(1)</sup></i>    |                  |                       |                  |
| CCANP18 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP19 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP20 | MdC (d)                | <i>Mloti</i>                | <i>M. ciceri</i>                        | HF931044         | loti                  | HF933974         |
| CCANP21 | MdC (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP22 | MdC (d)                | <i>Mloti</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP23 | MdC (d)                | <i>Mloti</i>                |   |                  | loti                  | HF933975         |
| CCANP24 | MdC (t)                | <i>Mci</i>                  | <i>M. ciceri</i>                        | HF931045         | loti                  | HF933976         |
| CCANP25 | MdC (t)                | <i>Mci</i>                  |   |                  | loti                  | HF933977         |
| CCANP26 | MdC (t)                | <i>Maus</i>                 |   |                  |                       |                  |
| CCANP27 | MdC (t)                | <i>Mloti</i>                | <i>M. ciceri</i>                        | HF931046         | loti                  | HF933978         |
| CCANP28 | RL (t)                 | <i>Mopp</i>                 |   |                  |                       |                  |
| CCANP29 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                | <i>M. tianshan-SGr</i>                  | HF931047         | loti                  | HF933979         |
| CCANP30 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP31 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP32 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP33 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                | <i>M. tianshan-SGr</i>                  | HF931048         | loti                  | HF933980         |
| CCANP34 | FdM (t)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-I</i>                   | HF931049         | new                   | HF933981         |
| CCANP35 | FdM (t)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-I</i>                   | HF931050         | new                   | HF933982         |
| CCANP36 | FdM (t)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-I<sup>(1)</sup></i>     |                  |                       |                  |
| CCANP37 | FdM (t)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-I<sup>(1)</sup></i>     |                  |                       |                  |
| CCANP38 | FdM (t)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-I</i>                   | HF931051         | new                   | HF933983         |
| CCANP40 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP41 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP42 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP43 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP44 | MdC (t)                | <i>Mtian</i>                |   |                  |                       |                  |
| CCANP45 | MdC (t)                | <i>Mcarag</i>               |   |                  |                       |                  |
| CCANP47 | Ria (t)                | <i>Mci</i>                  |   |                  |                       |                  |
| CCANP48 | Ria (t)                | <i>Mci</i>                  | <i>M. ciceri</i>                        | HF931052         | ciceri                | HF933984         |
| CCANP53 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II<sup>(1)</sup></i>    |                  |                       |                  |
| CCANP54 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II<sup>(1)</sup></i>    |                  |                       |                  |
| CCANP55 | BdH (d)                | <i>Mlo-SBr</i>              | <i>M. loti-SBr</i>                      | HF931053         | loti                  | HF933985         |
| CCANP56 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               |   |                  |                       |                  |
| CCANP58 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II</i>                  | HF931054         | loti                  | HF933986         |
| CCANP59 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II<sup>(1)</sup></i>    |                  |                       |                  |
| CCANP61 | BdH (d)                | <i>Mlo-SBr</i>              | <i>M. loti-SBr</i>                      | HF931055         | loti                  | HF933987         |
| CCANP62 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II<sup>(1)</sup></i>    |                  |                       |                  |
| CCANP63 | BdH (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II</i>                  | HF931056         | loti                  | HG003676         |
| CCANP64 | Bej (d)                | <i>Maus</i>                 | <i>M. australicum</i>                   | HF931057         | loti                  | HF954915         |
| CCANP65 | Bej (d)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II</i>                  | HF931058         |                       |                  |
| CCANP66 | Bej (d)                | <i>Mlo-SBr</i>              |   |                  |                       |                  |
| CCANP67 | Bej (d)                | <i>Mopp</i>                 |   |                  |                       |                  |
| CCANP68 | Ria (d)                | <i>Mtian</i>                |   |                  | loti                  | HF933988         |
| CCANP70 | Ria (t)                | <i>Mam/Mtiua</i>            | <i>M. amorphae-like</i>                 | HF931059         | new                   | HF933989         |
| CCANP73 | Ria (d)                | <i>Mopp</i>                 | <i>M. opportunistum</i>                 | HF931060         | new                   | HF933990         |
| CCANP75 | Bej (t)                | <i>Maus</i>                 |   |                  |                       |                  |
| CCANP76 | Bej (t)                | <i>Mtian</i>                | <i>M. tianshan-SGr</i>                  | HF931061         |                       |                  |
| CCANP77 | Bej (t)                | <i>Mcarag</i>               | <i>M. caraganae-II</i>                  | HF931062         |                       |                  |
| CCANP78 | RdC (t)                | <i>Mtian</i>                | <i>M. tianshan-SGr</i>                  | HF931063         |                       |                  |
| CCANP79 | RdC (t)                | <i>Mci</i>                  | <i>M. ciceri</i>                        | HF931064         | ciceri                | HF933991         |
| CCANP80 | RdC (t)                | <i>Mci</i>                  |   |                  | ciceri                | HF933992         |
| CCANP82 | RdC (t)                | <i>Mci</i>                  | <i>M. ciceri</i>                        | HF931065         | ciceri                | HF933993         |

| Cepa     | Localidad <sup>a</sup> | Grupo 16S RFLP <sup>b</sup> | Filogenia ADNr16S (especie más próxima) | Número de acceso | Simbiotipo (gen nodC) | Número de acceso |
|----------|------------------------|-----------------------------|---|------------------|-----------------------|------------------|
| CCANP83  | RdC (t)                | Mtian                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP84  | RdC (t)                | Mam/Mhua                    |   |                  | loti                  | HF933994         |
| CCANP85  | RdC (t)                | Mci                         | M. ciceri                               |                  |                       |                  |
| CCANP86  | RdC (t)                | Mci                         |   |                  |                       |                  |
| CCANP87  | RdC (t)                | Mam/Mhua                    | M. amorphae                             | HF931067         | loti                  | HF933995         |
| CCANP88  | RdC (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I <sup>(1)</sup>           |                  |                       |                  |
| CCANP89  | RdC (t)                | Mtian                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP90  | FdM (t)                | Mtian                       | M. tianshan-SGr                         | HF931068         |                       | HG003677         |
| CCANP91  | FdM (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I <sup>(1)</sup>           |                  |                       |                  |
| CCANP92  | FdM (t)                | Mcarag                      |   |                  |                       |                  |
| CCANP93  | FdM (t)                | Mci                         | M. ciceri                               | HF931069         | ciceri                | HF933996         |
| CCANP94  | FdM (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I                          | HF931070         |                       |                  |
| CCANP95  | FdM (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I                          | HF931071         | new                   | HF933997         |
| CCANP96  | MdC (t)                | Mtian                       | M. tianshan-SGr                         | HF931072         | loti                  | HF933998         |
| CCANP98  | MdC (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I <sup>(1)</sup>           |                  |                       |                  |
| CCANP99  | Bej (t)                | Mopp                        | M. opportunistum                        | HF931073         |                       |                  |
| CCANP100 | Bej (t)                | Mopp                        | M. opportunistum                        | HF931074         |                       |                  |
| CCANP101 | Bej (t)                | Mopp                        |   |                  |                       |                  |
| CCANP102 | Bej (t)                | Mopp                        |   |                  |                       |                  |
| CCANP103 | Bej (t)                | Maus                        |   |                  |                       |                  |
| CCANP104 | Bej (t)                | Mopp                        |   |                  |                       |                  |
| CCANP105 | Bej (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-II                         | HF931075         |                       |                  |
| CCANP106 | Bej (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-II                         | HF931076         |                       |                  |
| CCANP107 | Bej (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-II <sup>(1)</sup>          |                  |                       |                  |
| CCANP108 | BdH (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-II <sup>(1)</sup>          |                  |                       |                  |
| CCANP109 | BdH (t)                | Mopp                        | M. opportun-like                        | HF931077         | loti                  | HF933999         |
| CCANP110 | BdH (t)                | Mopp                        |   |                  |                       |                  |
| CCANP113 | BdD (d)                | Mopp                        |   |                  | loti                  | HF934000         |
| CCANP114 | BdD (d)                | Mopp                        |   |                  |                       |                  |
| CCANP115 | BdD (t)                | Mcarag                      |   |                  |                       |                  |
| CCANP117 | BdD (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I                          | HF931078         | loti                  | HF934001         |
| CCANP119 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP121 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP122 | BdB (t)                | Mtama                       | M. tamadayense                          | HF931079         | loti                  | HF934002         |
| CCANP123 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP124 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP125 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP126 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP127 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  | loti                  | HF934003         |
| CCANP128 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP130 | BdB (t)                | Mtama                       | M. tamadayense                          | HF931080         | loti                  | HF934004         |
| CCANP131 | BdB (t)                | Mtama                       |   |                  |                       |                  |
| CCANP133 | BdI (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I                          | HF931081         | loti                  | HF934005         |
| CCANP134 | BdI (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I <sup>(1)</sup>           |                  |                       |                  |
| CCANP135 | BdI (t)                | Mcarag                      | M. caraganae-I <sup>(1)</sup>           |                  |                       |                  |
| CCANP138 | BdI (t)                | Mcarag                      |   |                  |                       |                  |

**Tabla 1.** Cepas, localidades y algunas características genéticas de los rizobios de Cicer canariense.

<sup>a</sup> **Localidades:** MdC: Mirador de las Chozas, FdM: Fuente de la Mula, RdC: Roque de los Cuervos, Ria: El Riachuelo, Bej: Bejenado sur, RL: Risco Liso alto, BdH: Barranco de los Hombres, BdD: Barranco de Dornajito, BdB: Barranco de Bristas, BdI: Barranco de Izcaqua. Entre paréntesis: (d) aislados directos; (t) plantas trampas.

<sup>b</sup> **Mcarag:** M. caraganae; **Mloti:** M. loti; **Mam/Mhua:** M. amorphae/M. huakuii; **Maus:** M. australicum; **Mopp:** M. opportunistum; **Mtian:** M. tianshanense; **M. tianshan-SGr:** M. tianshanense-subgroup; **Mlo-Sbranch:** M. loti-subbranch; **Mci:** M. ciceri; **Mtama:** M. tamadayense.

<sup>(1)</sup> Deducido a partir de la secuencia de un fragmento parcial del 16S rADN (400nt).

**Table1.** Strains, locations and some genetic characteristics of the Cicer canariense rhizobia.

<sup>a</sup> **Locations:** MdC: Mirador de las Chozas, FdM: Fuente de la Mula, RdC: Roque de los Cuervos, Ria: El Riachuelo, Bej: Bejenado sur, RL: Risco Liso alto, BdH: Barranco de los Hombres, BdD: Barranco de Dornajito, BdB: Barranco de Bristas, BdI: Barranco de Izcaqua. In brackets: (d) direct isolation; (t) trap plant.

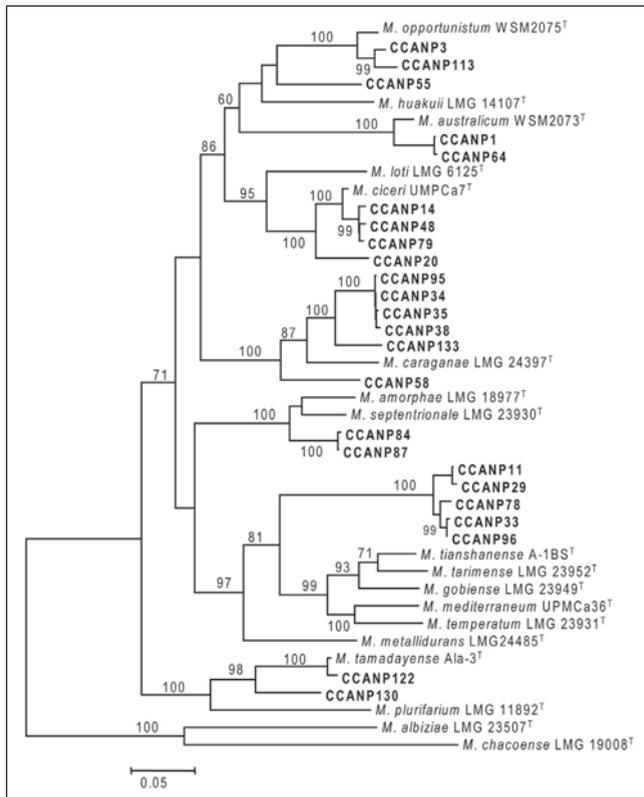
<sup>b</sup> **Mcarag:** M. caraganae; **Mloti:** M. loti; **Mam/Mhua:** M. amorphae/M. huakuii; **Maus:** M. australicum; **Mopp:** M. opportunistum; **Mtian:** M. tianshanense; **M. tianshan-SGr:** M. tianshanense-subgroup; **Mlo-Sbranch:** M. loti-subbranch; **Mci:** M. ciceri; **Mtama:** M. tamadayense.

<sup>(1)</sup> Deducded from sequencing of a 16S rDNA partial fragment (400nt).

La filogenia del gen *rrs* (Figura 1) correlacionó bien con la diversidad de ribotipos delineados previamente mediante sus perfiles 16S-RFLP para los grupos *M. ciceri*, *M. opportunistum*, *M. australicum*, *M. amorphae* y *M. tamadayense*. Los aislados de la subrama-*M. loti* representaron sin embargo, un nuevo linaje próximo a *M. loti* pero también a otras especies. La filogenia ribosomal no pudo resolver las relaciones de los aislados del segundo ribotipo mayoritario con las especies de referencia de *M. tianshanense*/*M. gobiense*/*M. tarimense*/*M. metallidurans*. El análisis de estas secuencias, sin embargo, detectó divergencia entre los aislados de uno de los ribotipos mayoritarios, *M. caraganae*, distinguiendo dos subgrupos que denominamos *M. caraganae*-I y *M. caraganae*-II.

El alto grado de conservación de las secuencias *rrs* entre las especies de *Mesorhizobium* no permitió sacar conclusiones taxonómicas definitivas. Por

ello, se realizó un análisis filogenético con secuencias parciales de siete genes codificantes de proteínas, *recA*, *glnII*, *dnaK*, *gyrB*, *rpoB*, *thrA*, *truA*. La filogenia individual de cada uno de los 7 genes, coincidió, con alguna pequeña discrepancia, en la discriminación de los mismos nueve grupos genómicos o genospecies delineados previamente en la filogenia del *rrs* (PÉREZ YÉPEZ *et al.* 2014). Ahora bien, la filogenia derivada de la concatenación de las secuencias de los siete genes “house-keeping” (3615 nucleótidos) produjo una filogenia más robusta (Figura 2) que permitió resolver la taxonomía de la mayoría de los aislados de *C. canariense*. Cinco genospecies formaron clados bien definidos (con alto valor de *bootstrap*) y porcentajes de similitud  $\geq 96\%$  (en secuencias concatenadas de los 7 genes) con cinco especies de *Mesorhizobium* previamente descritas: *M. ciceri*, *M. australicum*, *M. opportunistum*, *M. tamadayense* y *M. amorphae*/*M. septentrionale*, lo que permite su



**Figura 2.** Árbol filogenético basado en la concatenación de siete genes codificantes de proteínas (3615 nt): *dnaK* (234 nt), *gyrB* (588 nt), *truA* (330 nt), *glnII* (513 nt), *thrA* (702 nt), *recA* (378 nt) y *rpoB* (870 nt), de aislados de *Cicer canariense* (en negrita), y todas las especies descritas del género *Mesorhizobium*. Se usó el método Maximum Likelihood para la reconstrucción filogenética. La significación de cada rama es indicada por los valores de bootstrap ( $\geq 60\%$ ). La escala indica el número de sustituciones por sitio. (Tomado de Pérez-Yépez *et al.* 2014)

**Figure 2.** Maximum Likelihood phylogenetic tree based on concatenation of seven protein-coding genes (3615 nt): *dnaK* (234 nt), *gyrB* (588 nt), *truA* (330 nt), *glnII* (513 nt), *thrA* (702 nt), *recA* (378 nt) and *rpoB* (870 nt) showing the phylogenetic relationships of *Cicer canariense* isolates (in bold) and the currently recognized species of the *Mesorhizobium* genus. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value ( $\geq 60\%$ ) calculated for 1000 subsets. The scale bar indicates the number of substitutions per site. (Taken from Pérez-Yépez *et al.* 2014)

asignación a estas especies. Sin embargo, los aislados pertenecientes a las genoespecies denominadas subgrupo-*M. tianshanense* y *M. caraganae*-I y *M. caraganae*-II constituyen clados bien delineados que no incluyen ninguna de las especies de *Mesorhizobium* descritas hasta la fecha, y por ello, deben considerarse nuevas genoespecies del género *Mesorhizobium*, que han de ser caracterizadas fenotípicamente y descritas como especies. Otros genotipos minoritarios también representan linajes compatibles con nuevas especies del género.

### **Análisis filogenético de genes simbióticos: simbiovares**

Las filogenias de los genes de nodulación, *nodC* (Figura 3) y *nodA* (no mostrado), fueron totalmente congruentes y agruparon a los simbioses de *C. canariense* en tres linajes simbióticos que se corresponden con dos simbiovares ya descritos, simbiovares loti y ciceri y un nuevo simbiovar no detectado hasta ahora.

La mayoría de las cepas aisladas de *C. canariense* comparten secuencias altamente similares a mesorizobios de referencia como *M. loti* NZP2213<sup>T</sup>, R7A y MAFF303099, que son los simbioses típicos que nodulan *Lotus* spp. y cuyas secuencias simbióticas conforman el denominado simbiovar loti. Estos genes del simbiovar loti parecen transferirse fácilmente entre las especies de mesorizobios que nodulan *C. canariense* ya que fueron detectados en cepas pertenecientes a cualquiera de las nueve genoespecies. Dentro de este gran clado del simbiovar loti se pueden distinguir, sin embargo, varias sub-ramas. Una contiene sólo las cepas de referencia de los mesorizobios de los *Lotus*, mientras que las restantes incluyen los aislados de *C. canariense*. Una de ellas, agrupa cepas de hasta siete especies o genoespecies (*M. caraganae*-I, *M. caraganae*-II, *M. ciceri*, *M. opportunistum*, *M. australicum*, subgrupo-*M. loti* y *M. amorphae*). De las otras dos restantes, una sólo contienen los aislados del subgrupo-*M. tianshanense* y la otra las cepas de la especie *M. tamadayense*.

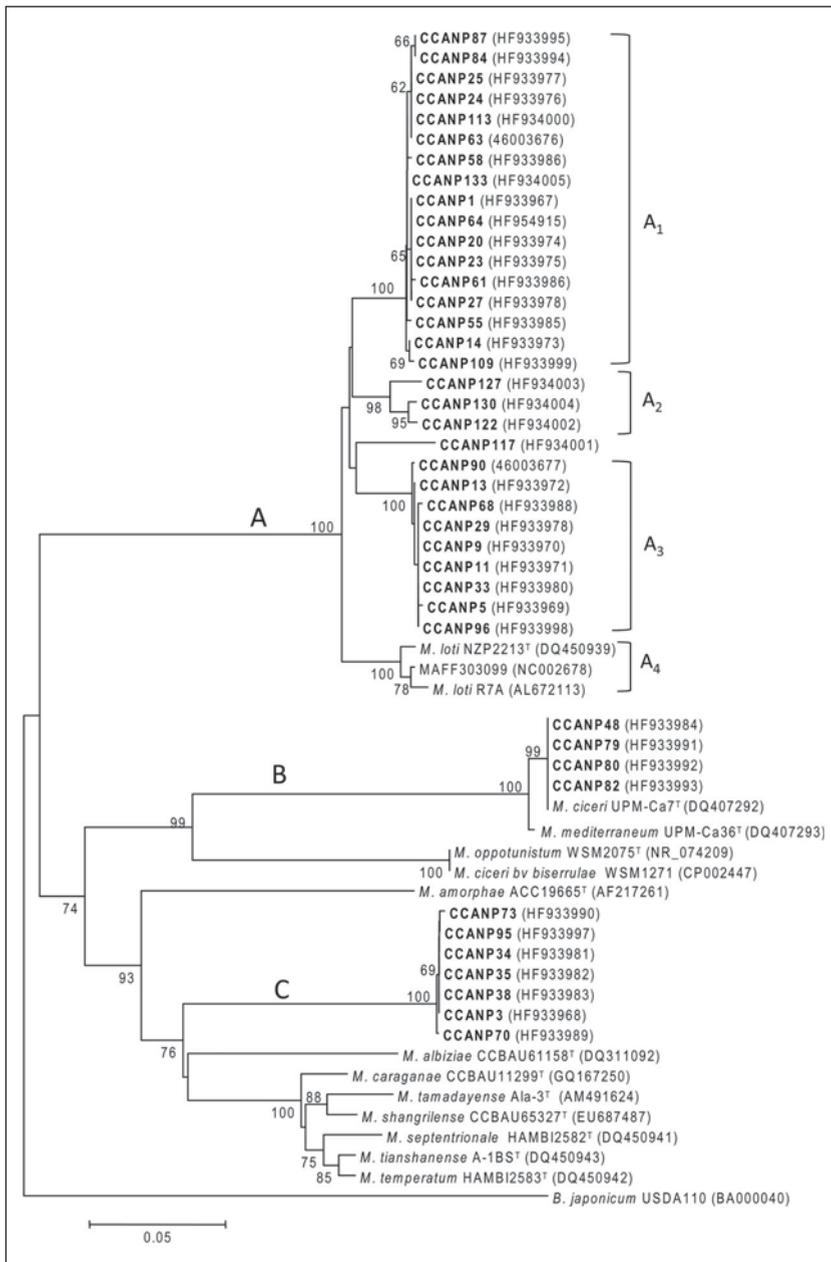
Por otro lado, un grupo pequeño de cepas, todas clasificadas como *M. ciceri*, portan secuencias idénticas a la cepa tipo de la especie *M. ciceri*,

USDA 3383<sup>T</sup>, y por ello, se incluyen en el simbiovar ciceri (el simbiovar que se encuentra en todos los rizobios que nodulan *C. arietinum*).

Finalmente, un tercer grupo de cepas pertenecientes a las genoespecies *M. caraganae*-I y *M. opportunistum* y la cepa CCANP70, presentaron secuencias que las agrupan en una rama distante al resto de simbiovares conocidos (Figura 3), lo que sugiere que es un simbiovar nuevo que parece ser específico de rizobios que nodulan *C. canariense*.

Puesto que el simbiovar ciceri fue uno de los encontrados entre los rizobios que nodulan *C. canariense* en suelos de La Palma, se hicieron crecer plantas trampa de esta especie en un suelo del territorio peninsular español donde tradicionalmente se cultiva el garbanzo comercial (*C. arietinum*) y donde se ha descrito la presencia de rizobios del simbiovar ciceri. El fin era investigar la nodulación de la garbancera canaria en estos suelos peninsulares. Sorprendentemente, todas las plantas estaban noduladas pero por rizobios de crecimiento rápido del género *Rhizobium* muy próximos a *R. leguminosarum* y que llevaban genes simbióticos pertenecientes al simbiovar trifolii (MARTINEZ-HIDALGO *et al.* 2015a), un resultado no esperado, ya que los rizobios de este simbiovar nodulan *Trifolium* spp. y *Trigonella*.

Para contrastar el esquema evolutivo de los genes de nodulación, *nodA* y *nodC*, se construyó una filogenia basada en el gen de fijación *nifH*. Los resultados mostraron que esta filogenia es congruente con la de los genes de nodulación, para el simbiovar ciceri y el simbiovar nuevo, sin embargo, *nifH* presentó una discrepancia notable en el grupo mayoritario de cepas incluidas en el simbiovar loti (MARTINEZ-HIDALGO *et al.*, 2015b), pues la filogenia de este gen separó a las cepas de este simbiovar en dos subgrupos distantes que denominamos *nifH*-1 y *nifH*-2. El subgrupo *nifH*-1 agrupó a las cepas de las genoespecies subgrupo-*M. tianshanense* y *M. tamadayense* junto con las cepas de referencia que nodulan *Lotus* spp. (*M. loti* NZP2213, R7A y MAFF303099). Por el contrario, el subgrupo *nifH*-2 fue exclusivo, sólo incluyó cepas de siete genoespecies que nodulan *C. canariense*, a excep-



**Figura 3.** Árbol filogenético basado en un fragmento de 672 nt del gen *nodC* de los aislados de *Cicer canariense* y cepas de referencia. La significación de cada rama está indicada por valores de bootstrap ( $\geq 60\%$ ) calculado a partir de 500 pseudoréplicas. Se usó el método Maximum Likelihood (modelo Tamura-3-parameter con gamma distribuciones y sitios invariables). La escala indica el número de sustituciones por sitio. (Tomado de Armas-Capote et al. 2014)

**Figure 3.** Maximum Likelihood (Tamura-3-parameter with gamma distribution and invariant sites) phylogenetic tree based on *nodC* sequences (672 nt) of the *Cicer canariense* isolates and reference strains. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value ( $\geq 60\%$ ) calculated for 500 subsets. The scale bar indicates the number of substitutions per site. (Taken from Armas-Capote et al. 2014)

ción de una cepa, WSM1284, aislada de *Biserrula pellicinus* en Australia (NANDASENA *et al.* 2006). Estas dos variantes de *nifH* pueden distinguirse también en la secuencia de la proteína por los aminoácidos en las posiciones 53, 143, 197 y 202 (referidos a la secuencia NifH de la cepa MAFF303099). Además, los dos aislados de *M. tamadayense*, cepas CCANP122 y CCANP130, tienen dos glutámicos en las posiciones 65 y 75, mientras que el resto de cepas de este subgrupo tienen glutamina.

### Evaluación de fenotipos simbióticos

Una selección de cepas representativas de distintos simbiovares y genospecies se utilizó para evaluar los fenotipos simbióticos (número de nódulos por plantas, peso fresco y peso seco por planta, eficacia simbiótica y contenido en nitrógeno).

Las cepas del simbiovar *ciceri*, *M. ciceri* CCANP48 y CCANP79, fueron las únicas capaces de nodular *C. arietinum*. Sin embargo, estas cepas en *C. canariense*, a pesar de que nodularon bien, produjeron un pobre desarrollo de las plantas y, por ello, pueden ser consideradas de escasa eficacia en esta especie de *Cicer*. Cepas del simbiovar nuevo como *M. caraganae*-I CCANP35, produjeron una eficacia simbiótica moderada en las condiciones de ensayo. Estas cepas presentan un crecimiento muy lento, y es posible que se nece-

siten mayores inóculos o tiempos más largos de experimentación a las 8 semanas que se dejaron crecer las plantas para obtener eficacias mejores.

Especial atención se prestó al comportamiento de cepas del simbiovar mayoritario, *loti*, en diferentes fondos cromosómicos (distintas genospecies) y con diferentes variedades de *nifH*. Los resultados de las cepas *M. tamadayense* CCANP122 sv. *loti*, *M. ciceri* CCANP14 sv. *loti* y subgrupo-*M. tianshanense* CCANP33 sv. *loti*, se recogen en la Tabla 2. Los resultados mostraron que los genes del simbiovar *loti* en todos los distintos fondos cromosómicos (genospecies) producen cepas capaces de nodular y fijar nitrógeno en *C. canariense*. Estas cepas, en congruencia con otras cepas del simbiovar *loti*, también forman nódulos eficaces en *Lotus corniculatus*. También las dos cepas de colección usadas como referencia, *M. loti* NZP2213<sup>T</sup> y *M. ciceri* USDA 3383<sup>T</sup>, formaron nódulos en *C. canariense* (Tabla 2). No se encontraron entre los distintos tratamientos diferencias significativas en el número de nódulos, que fue en general relativamente bajo ( $\leq 20$  nodules) en la inoculación con todas las cepas, lo que sugiere que ello es una característica de la planta o de las condiciones de ensayo. Sin embargo, si se observaron grandes diferencias en el desarrollo de las plantas entre los tratamientos con distintas cepas del simbiovar *loti* en distintos fondos cromosómicos. Todas las combinaciones produjeron un efecto positivo en

| Cepa  | Nódulos / Planta<br>(±D.E.) | PSA<br>(g/plant) (±D.E.) | N<br>(g/plant) (±D.E.) | ES<br>(%) |
|---|-----------------------------|--------------------------|------------------------|-----------|
| Control negativo (No inoculado)                               | 0(±)c                       | 0.1 (±0.02)b             | 0.06 (±0.02)bc         |           |
| Control positivo (N-suplementado)                             | 0 (±)c                      | 0.29 (±0.019)a           | 0.32 (±1.2)a           |           |
| <i>M. ciceri</i> CCANP14 sv. <i>loti</i> (NifH-2)             | 14.1 (±4.2)a                | 0.13 (±0.017)b           | 0.11 (±0.03)bc         | 16        |
| <i>M. tianshanense</i> -like CCANP33 sv. <i>loti</i> (NifH-1) | 13.7 (±3.2)a                | 0.12 (±0.016)b           | 0.08 (±0.03)bc         | 11        |
| <i>M. tamadayense</i> CCANP122 sv. <i>loti</i> (NifH-1)       | 12.5 (±4.8)ab               | 0.26 (±0.018)a           | 0.34 (±1.5)a           | 85        |
| <i>M. loti</i> NZP 2213 <sup>T</sup> sv. <i>loti</i> (NifH-1) | 11.7 (±4.7)ab               | 0.17 (±0.017)b           | 0.15 (±0.05)b          | 35        |
| <i>M. ciceri</i> USDA3383 <sup>T</sup> sv. <i>ciceri</i>      | 10.6 (±4.3)ab               | 0.10 (±0.017)b           | 0.06 (±0.02)c          | 0         |

**Tabla 2.** Fenotipos simbióticos de los aislados y cepas de referencia en plantas de *C. canariense*. (Tomado de Martínez-Hidalgo *et al.* 2015) Datos con la misma letra no son considerados significativamente diferentes acorde con el test de Tukey HSD ( $p \leq 0.05$ ). PSA: peso seco parte aérea, ES: eficacia simbiótica, N: contenido de nitrógeno por planta, D E. desviación estándar.

**Table 2.** Symbiotic phenotypes of the isolates and reference strains on *C. canariense* plants (Taken from Martínez-Hidalgo *et al.* 2015) Data with the same letter are not significantly different according to Tukey's HSD test ( $p \leq 0.05$ ). SDW: shoot dry weight, SEF: symbiotic effectiveness, N: nitrogen content per plant, S.D. standard deviation.

el desarrollo de las plantas (MARTÍNEZ-HI-GALDO *et al.* 2015), pero el mejor resultado se obtuvo con la cepa CCANP122, perteneciente a la especie *M. tamadayense* y al simbiovar *loti* (variante NifH2), con la que se obtuvo una eficacia simbiótica del 85%, un desarrollo comparable al de las plantas suplementadas con nitrógeno exógeno (4 mM KNO<sub>3</sub>) en la solución de riego. Aunque las medidas de peso seco y la eficacia simbiótica fueron baja para otras cepas distintas de CCANP122, el hecho de que *C. canariense* sea una planta con hojas muy estrechas y que produce en las condiciones de ensayo en laboratorio poca masa, hace posible que pequeñas diferencias en peso sean aún importantes. El contenido en nitrógeno refleja mejor la respuesta positiva de las plantas a la inoculación con los rizobios (Tabla2), que (aunque estadísticamente no significativa) contenía cantidades hasta 2,5 veces superior al de las plantas no inoculadas.

### Rizobios y otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal

Veintiséis cepas se seleccionaron para evaluar la presencia de otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal diferentes al aporte de nitrógeno por FBN. Los resultados mostraron que todas las cepas seleccionadas muestran al menos un mecanismo de promoción vegetal y algunas de ellas presentan conjuntamente dos o más de los mecanismos ensayados. Todas las cepas produjeron AIA, aunque las cantidades variaron mucho entre cepas, siendo CCANP122, CCANP14 y CCANP61 las que sintetizaron las mayores cantidades. La solubilización de fósforo se observó en el 35% de las cepas testadas que, con algunas excepciones, fueron todas cepas pertenecientes a la especie *M. ciceri*; entre ellas, la cepa CCANP14 fue la más eficaz solubilizadora (90% de eficacia). La evaluación en la síntesis de sideróforos reveló que el 14% de las cepas, pertenecientes a varias genoespecies, fueron positivas en la producción de algún tipo de sideróforos. Por último, en cuanto a la presencia del gen *acdS*, que codifica para la 1-amino-1-ciclopropano carboxilato desaminasa (ACCd), pudo ser amplificado en el 57% de las cepas ensayadas. En la filogenia de este gen, los agrupamientos de cepas se correlacionaron total o parcialmente con

los simbiovares, lo que sugiere que, al igual que se ha descrito en algunos mesorhizobios como la cepa MAFF303099, este gen podría encontrarse alojado con los genes simbióticos en la "isla simbiótica". Cuando las cepas que dieron positivas para la presencia del gen *acdS* se cultivaron en ACC como fuente de nitrógeno, ninguna fue capaz de crecer, lo que sugiere su incapacidad para expresar la ACCd en vida libre, otro hecho más que apunta a su localización en la isla simbiótica, su expresión en vida simbiótica y regulada por esos genes.

## DISCUSIÓN

El estudio que hemos realizado es la primera caracterización de las bacterias que establecen una simbiosis fijadora de nitrógeno con la leguminosa *Cicer canariense*. Los análisis genéticos (utilizando técnicas de "fingerprint") y filogenéticos (basados en la secuenciación de ocho genes cromosómicos esenciales) han revelado que *C. canariense* es una leguminosa promiscua que permite la nodulación por rizobios muy diversos, pertenecientes a distintas especies y distintos simbiovares. Los análisis de la secuenciación del gen del ARNr 16S y de otros siete genes codificantes de proteínas distinguieron entre los aislados de *C. canariense* nueve grupos genómicos o genoespecies que se corresponden con especies diferentes del género *Mesorhizobium*. MLSA permitió afiliar cinco de estos grupos a especies de mesorizobios ya descritas previamente: *M. ciceri*, *M. australicum*, *M. opportunistum*, *M. tamadayense* y *M. amorphae* / *M. septentrionale* (posiblemente la misma especie), mientras que otras, los grupos *M. caraganae*-I, *M. caraganae*-II, subgrupo-*M. tianshanense* y alguno de los linajes minoritarios de aislados, parecen representar especies nuevas para el género, que han de ser descritas.

Si bien en los últimos años se ha descrito también en *C. arietinum* la existencia de una mayor diversidad de especies que las dos previamente reconocidas (ALEXANDRE *et al.* 2008; LARANJO *et al.* 2012), existe una diferencia muy importante entre ambas especies de *Cicer* en cuanto a los genes simbióticos. Todos los rizobios simbioses de *C. arietinum* portan un mismo grupo de genes

altamente similares, aquellos conocidos como simbiovar ciceri (RIVAS *et al.* 2007; LARANJO *et al.* 2008; LARANJO *et al.* 2012; ZHANG *et al.* 2012b), lo que indica que es una leguminosa restrictiva. Por el contrario, en los rizobios que nodulan *C. canariense* la situación es mucho más compleja puesto que puede portar genes simbióticos de hasta cuatro linajes distantes. En su hábitat natural de la isla de La Palma se ha encontrado que *C. canariense* puede ser nodulada por mesorizobios del simbiovar ciceri, simbiovar loti y un simbiovar nuevo que parece ser específico de *C. canariense*, mientras que en suelos de la Península Ibérica es nodulada por *Rhizobium* sp. simbiovar trifolii. Entre estos simbiovars, *C. canariense* parece tener preferencia por los rizobios que portan el simbiovar loti. Dado que *Lotus* (*L. campylocladus* ssp. *hillebrandii*) es la especie acompañante más abundante en los hábitats donde crece *C. canariense*, parece probable que, mediante eventos genéticos de transferencia horizontal, los rizobios de los *Lotus* spp. hayan sido la fuente principal de los genes simbióticos (simbiovar loti) para los rizobios que nodulan *C. canariense*.

Los ensayos de infectividad en *C. canariense* con cepas de distinto simbiovar o de un simbiovar en diferentes fondos cromosómicos resulta en eficacias simbióticas muy variables (MARTÍNEZ-HI-

DALGO *et al.* 2015), lo que indica la importancia de seleccionar las mejores genotipos y simbiotipos a la hora de usarlos como inoculantes en los ensayos de campo. Además, entre las mejores cepas fijadoras de nitrógeno, podemos hacer una segunda selección en cuanto a la presencia de otras propiedades promotoras de crecimiento vegetal. En este sentido destacaron las cepas *M. ciceri* CANP14 sv. loti y *M. tamadayense* CCANP122 sv. loti, que combinaron otras propiedades promotoras. Una plantación realizada en parcelas de experimentación en el Parque con plantas previamente noduladas mostraron una supervivencia en campo significativamente mayor con respecto a las plantas no inoculadas (datos no publicados), indicando que la inoculación previa con rizobios en fase de invernadero puede ser una buena estrategia para el establecimiento de nuevas zonas de plantación.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al director del Parque de La Caldera de Taburiente, Ángel Palomares, por facilitarnos el trabajo en el Parque y cedernos las semillas de *Cicer canariense*, y a Antonio Rodríguez Lerín por su ayuda en la localización de las poblaciones de *C. canariense* y en el trabajo de campo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, M., RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N., CAMACHO, M. & TEMPRANO, F.J. 2008. Alternative to peat as carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2771-2779
- ALEXANDRE, A., BRÍGIDO, C., LARANJO, M., RODRIGUES, S. & OLIVEIRA, S. 2009. Survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. *Microbial Ecology* 58: 930-941
- ALEXANDER, D.B. & ZUBERER, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils*. 12: 39-45
- ARDLEY, J.K., PARKER, M.A., DE MEYER, S.E., TRENGROVE, R.D. *et al.* 2012. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2579-2588
- ARMAS-CAPOTE, N., PÉREZ-YÉPEZ, J., MARTÍNEZ-HIDALGO, P., GARZÓN-MACHADO, V., DEL ARCO-AGUILAR, M., VELÁZQUEZ, E. & LEÓN-BARRIOS, M. 2014. Core and symbiotic genes reveal nine *Mesorhizobium* genospecies and three symbiotic lineages among rhizobia nodulating *Cicer canariense* in its natural habitat (La Palma, Canary Islands). *Systematic and Applied Microbiology* 37: 140-148

- ASGHAR, H.N., ZAHIR, Z.A., ARSHAD, M. & KHALIQ, A. (2002). Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils* 35: 231-237
- BERRADA, H. & FRIKRI-BENBRAHIM, K. 2014. Taxonomy of the Rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal* 4: 616-639
- CANFIELD, D.E., GLAZER, A.N. & FALKOWSKI, P.G. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*. 330: 192-196
- CARSON, K., MEYER, J.M. & DILWORTH, M. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 11-21
- CHAINHARN, M. & LUMYONG, S. 2011. Screening and optimization of Indole-3-Acetic acid production and phosphate solubilization from Rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current Microbiology* 62: 173-181
- DOVER, R.C., BREIL, B.T. & TRIPLET, E.W. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship with other nodulating bacteria. *Molecular Plant Microbe Interaction* 7: 564-572
- EBERL, L. & TÜMMERL, B. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology* 294: 123-131
- ESSALMANI, H. & LAHLOU, H. 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. Lentils. *Comptes Rendus Biologies* 326: 1163-1173
- GARCÍA-FRAILE, P., CARRO, L., ROBLEDO, M., RAMÍREZ-BAHENA, M.H., FLORES-FÉLIX, J.D., FERNÁNDEZ, M.T., MATEOS, P.F., RIVAS, R., IGUAL, J.M., MARTÍNEZ-MOLINA, E., PEIX, A. & VELÁZQUEZ, E. 2012. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PlosOne*. 7: 1-7
- GARRITY, G. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer. East Lansing, USA
- GARZÓN-MACHADO, V., GONZÁLEZ-MANCEBO, J.M., PALOMARES-MARTÍNEZ, A., ACEVEDO-RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.M., DEL ARCO, M. & PÉREZ DE PAZ, P.L. 2010. Strong negative effect of alien herbivores on endemic legumes of the Canary pine forest. *Biological Conservation* 143: 2685-2694
- GARZÓN-MACHADO, V. 2012. La vegetación de la Caldera de Taburiente: Factores determinantes de su composición florística, Department of Vegetal Biology, University of La Laguna, Tenerife, Canary Islands (PhD Thesis)
- GAUNT, M.W., TURNER, S.L., RIGOTTIER-GOIS, L., LLOYD-MACGILP, S. & YOUNG, J.P. 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.
- GIBSON, A.H. 1987. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. En: *Symbiotic nitrogen fixation technology*. Marcel Dekker (ed.). pp. 321-363. New York
- GLICK, B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251: 1-7.
- GLICK, B.R., CHENG, Z., CZARNY, J. & DUAN, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *Journal of Plant Pathology* 119: 329-339
- GÓMIZ, F. 2001. *Flora selecta Marroquí*. Francisco Javier Navarro Díez (ed.). 351 pp.
- GORDON, S.A. & WEBER, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indol-acetic acid. *Plant Physiology* 26: 192-195.
- GUMA, I.R., PADRÓN-MEDEROS, M.A., SANTOS-GUERRA, A. & REYES-BETANCORT, J.A. 2010. Evaluation of methods to remove hardseededness in *Cicer canariense*, a perennial wild chickpea. *Seed Science and Technology* 38: 209-213
- GYANESHWAR, P., HIRSCH, A.M., MOULIN, L., CHEN, W.M., ELLIOTT, G.N. *et al.* 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: Diversity, host range and future prospects. *Molecular Plant Microbe Interaction* 24: 1276-1288

- HAUKKA, K., LINDSTROM, K. & YOUNG, J.P.W. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 419-426
- HERNÁNDEZ, E. 1996. Nota corológica sobre *Cicer canariense* (Fabaceae-Papilionidae). *Vieraea*. 25: 227-228
- JARABO-LORENZO, A., VELÁZQUEZ, E., PÉREZ-GALDONA, R., VEGA-HERNÁNDEZ, M.C., MARTÍNEZ-MOLINA, E., MATEOS, P., VINUESA, P., MARTÍNEZ-ROMERO, E. & LEÓN-BARRIOS, M. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA and low molecular weight RNA profiling of rhizobial isolates from shrubby legumes endemic to the Canary Islands. *Systematic and Applied Microbiology* 23: 418-425
- JOURAND, P., GIRAULD, E., BÉNA, G., *et al.* 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2269-2273
- MASSON-BOIVIN, C., GIRAUD, E., PERRET, X. & BATUT, J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* 17: 458-466
- LARANJO, M., ALEXANDRE, A., RIVAS, R., VELÁZQUEZ, E., YOUNG, J.P.W. & OLIVEIRA, S. 2008. Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiology Ecology* 66: 391-400
- LARANJO, M., YOUNG, J.P.W. & OLIVEIRA, S. 2012. Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 359-367
- LEÓN-BARRIOS, M., LORITE, M.J., DONATE-CORREA, J. & SANJUAN, J. 2009. *Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 413-420
- LORITE, M.J., DONATE-CORREA, J., DEL ARCO-AGUILAR, M., PÉREZ-GALDONA, R., SANJUAN, J. & LEÓN-BARRIOS, M. 2010. *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 282-290.
- LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-546
- MARTENS, M., DAWYNDT, P., COOPMAN, R., GILLIS, M., DE VOS, P. & WILLEMS, A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 200-214
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P., FLORES-FÉLIX, J.D., MENÉNDEZ, E., RIVAS, R., CARRO, L., MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., LEÓN-BARRIOS, M. & VELÁZQUEZ, E. 2015. *Cicer canariense*, an endemic legume to the Canary Islands, is nodulated in mainland Spain by fast-growing strains from symbiovar *trifolii* phylogenetically related to *Rhizobium leguminosarum*. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 365-350
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P., PÉREZ-YÉPEZ, J., VELÁZQUEZ, E., PÉREZ-GALDONA, R., MARTÍNEZ-MOLINA, E. & LEÓN-BARRIOS, M. 2016. Symbiovar *loti* genes are widely spread among *Cicer canariense* mesorhizobia, resulting in symbiotically effective strains. *Plant and Soil* 398: 25-33.
- MORENO, J.C. 2008. Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección Gral Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente y M. Rural y Marino y Sociedad Española de Biología de Conservación de Plantas), pp. 86pp. Madrid
- MOULIN, L., MUNIVE, A., DREYFUS, B. & BOIVIN-MASSON, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411: 948-950
- NANDASENA, K.G., O'HARA, G.W., TIWARI, R.P. & HOWIESON, J.G. 2006. Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. Through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7365-7367

- NASCIMENTO, X.F., BRÍGIDO, C., GLICK, B.R. & OLIVEIRA, S. 2012. ACC deaminase genes are conserved among *Mesorhizobium* species able to nodulate the same host plant. *FEMS Microbiology Letters* 336: 26-37
- NOUR, S.M., FERNÁNDEZ, M.P., NORMAND, P. & CLEYET-MAREL, J.C. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 511-522
- NOUR, S.M., CLEYET-MAREL, J.C., NORMAND, P. & FERNÁNDEZ, M.P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 640-648
- OGUTCU, H., ADIGUZEL, A., GULLUCE, M., KARADAYI, M. & SAHIN, F. 2009. Characterization of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum-Turke. *Romanian Biotechnological Letters* 14: 4294-4300
- PATEL, K.J., SINGH, A.K., NARESHKUMAR, G. & ARCHANA G. 2010. Organic-acid-producing, phytate mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Applied Soil Ecology* 44: 252-261
- PÉREZ-YÉPEZ, J., ARMAS-CAPOTE, N., VELÁZQUEZ, E., PÉREZ-GALDONA, R., RIVAS, R. & LEÓN-BARRIOS, M. 2014. Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium*: Resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 553-559
- RAMÍREZ-BAHENA, M.H., HERNÁNDEZ, M., PEIX, A., VELÁZQUEZ, E. & LEÓN-BARRIOS, M. 2012. Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 334-341
- RICHARDSON, A.E., BAREA, J.M., MCNEILL, A.M. & PRIGENT-COMBARENT. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*. 321: 305-339
- RIVAS, R., LARANJO, M., MATEOS, P., OLIVEIRA, S., MARTÍNEZ-MOLINA, E. & VELÁZQUEZ, E. 2007. Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Letters in Applied Microbiology* 44: 412-418
- RIVAS, R., MARTENS, M., DE LAJUDIE, P. & WILLEMS, A. 2009. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 101-110
- SANTOS-GUERRA, A. & LEWIS, G.P. 1985. A new species of *Cicer* (*Leguminosae-Papilionideae*) from the Canary Islands. *Kew Bulletin* 41: 459-462
- SCHWYN, B. & NEILANDS, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56
- SHEKHAR, N.C., BHACLARIAI, S., KUMAR, P., LAL, H., MANDAL, R. & VERMA, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters* 182: 291-296
- SIMARD, S.W. & DURALL, D.M. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Canadian Journal of Botany* 82: 1140-1165
- SRIVASTAVA, S., YODOV, K.S. & KUNDU, B.S. 2004. Prospects of using phosphate by solubilizing *Pseudomonas* as biofungicide. *Indian Journal of Microbiology* 44: 91-94
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739
- TORSVIK, V., SÖRHEIM, R. & GOKSÖYR, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17: 170-178
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific publications (ed.). Oxford, U.K.

- VINUESA, P., LEÓN-BARRIOS, M., SILVA, C., WILLEMS, A., JARABO-LORENZO, A., PÉREZ-GALDONA, R., WERNER, D. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionideae: Genisteeae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 569-575
- WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, P.A. & LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703
- YANNI, Y.G., RIZK, R.Y., ABD EL FATTAH, F.K., SQUARTINI, A., CORICH, V., *et al.* 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Australian J. Plant Physiol.* 28: 845-870
- ZAHKAN, H.H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* 91: 143-153
- ZHANG, J.J., LIU, T.Y., CHEN, W.F., WANG, E.T., SUI, X.H., ZHANG, X.X., LI, Y. & CHEN, W.X. 2012<sup>a</sup>. *Mesorhizobium muleiense* sp. nov. nodulating with *Cicer arietinum* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2737-2742
- ZHANG, J.J., LOU, K., JIN, X., MAO, P.H., WANG, E.T., TIAN, C.F., SUI, X.H., CHEN, W.F. & CHEN, W.X. 2012<sup>b</sup>. Dinstinctive *Mesorhizobium* populations associated with *Cicer arietinum* L. In alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant and Soil.* 353: 123-134