

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN AGROBIOTECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Máster

**Aislamiento y caracterización de endosimbiontes nodulares
de leguminosas autóctonas para la recuperación de suelos
quemados**

Isolation and characterization of nodular endosymbionts from indigenous
legumes for the recovery of burnt soils

Autora: Lucía Jorge Matos

Bajo la tutela de Paula García Fraile y José David Flores Félix

Máster en Agrobiotecnología

Julio, 2024

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	2
2.1. Dinámica de los suelos quemados	2
2.2. Técnicas de recuperación de suelos quemados	5
2.3. Endosimbiontes nodulares de leguminosas	9
3. Objetivos.....	12
4. Materiales y métodos.....	13
4.1 Suelo quemado.....	13
4.3 Mantenimiento y conservación de las cepas.....	15
4.4 Caracterización genotípica.....	15
4.5 Ensayo de nodulación en cámara de cultivo	18
4.6 Ensayos en invernadero	19
5. Resultados y Discusión	20
5.1 Aislamiento de endosimbiontes a partir de plantas trampa	20
5.2 Análisis de la biodiversidad mediante perfiles de RAPD.....	22
5.4 Ensayo de nodulación en cámara iluminada.....	33
5.5 Ensayo de nodulación en invernadero	36
6. Conclusiones.....	41
7. Referencias bibliográficas	42

1. Resumen

Los incendios forestales tienen un impacto significativo en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, dificultando la revegetación y aumentando la erosión. Las leguminosas, gracias a su capacidad de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico juegan un papel crucial en la rehabilitación de estos suelos. Para ello se va a proceder al aislamiento y caracterización de endosimbiontes nodulares de *Vicia villosa*, *Lupinus angustifolius* y *Lotus corniculatus* para evaluar su potencial de adaptación a los suelos quemados y determinar su capacidad simbiótica para la mejora de los procesos de revegetación. Se aislaron varias cepas de rizobios, destacando la cepa MAFLC01 (*Bradyrhizobium carysi*) que mostró alta capacidad de nodulación y adaptación a las condiciones de los suelos quemados tras un incendio.

2. Introducción

2.1. Dinámica de los suelos quemados

Los incendios forestales son un fenómeno presente en el medio ambiente de manera natural, pero actualmente tienen una importante influencia antrópica siendo ocasionados por la acción humana en un elevado porcentaje y presentando una mayor frecuencia e intensidad que cuando ocurren únicamente de forma natural (Alcañiz et al., 2018; Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021; Morán-Ordóñez et al., 2020).

El suelo es un componente esencial del ecosistema forestal y después de sufrir un incendio presenta cambios directos tanto físicos como químicos y biológicos, asociados a las temperaturas a las que se expone. Estos cambios pueden afectar negativamente a la estructura, textura y funcionalidad y, además, pueden existir cambios indirectos como consecuencia de la pérdida de la cubierta vegetal y aparición de la cubierta de cenizas, como lo es una mayor susceptibilidad a la erosión tanto hídrica como eólica. Esto puede retrasar el crecimiento de una nueva cubierta vegetal y provocar una mayor erosión del suelo (Mastrolonardo et al., 2024; Mataix-Solera & Guerrero, 2007; Terribile, Spaccini, et al., 2024).

La magnitud de los cambios dependerá del tipo de incendio y su intensidad, así como del tipo de suelo y la vegetación preexistente. (Francos et al., 2023; Mataix-Solera & Guerrero, 2007; Morán-Ordóñez et al., 2020).

2.1.1. Efecto sobre las características fisicoquímicas

La estructura del suelo es distinta entre los diversos tipos de suelo y condiciona las propiedades físicas. La estabilidad de los distintos agregados del suelo influye directamente en la erosión y la infiltración de agua que presente ese suelo. La combustión de la materia orgánica reduce la estabilidad de los agregados modificando la dinámica hídrica de éstos. Asimismo, la lluvia también puede provocar la separación de los agregados que, junto con un aumento de la hidrofobicidad (repelencia al agua) debido principalmente al acúmulo de las cenizas y la volatilización de los compuestos orgánicos, provocan la reducción de la infiltración de agua y el aumento de la escorrentía, disminuyendo la humedad del suelo (Alcañiz et al., 2018; Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021; Morán-Ordóñez et al., 2020). Esto causa la reducción de la capacidad de intercambio catiónico del suelo, afectando a la retención de los nutrientes. Los cationes liberados no son retenidos y se produce su lixiviación o el arrastre por el suelo desnudo debido a la lluvia (Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021; Mataix-Solera & Guerrero, 2007).

En cuanto al pH generalmente se produce un aumento debido a que las cenizas aportan carbonatos, óxidos y cationes básicos al suelo. El incremento del pH no es persistente, ya que las cenizas pueden desaparecer por procesos de erosión. El pH es un parámetro fundamental para el funcionamiento de los diversos microorganismos del suelo y la captación de nutrientes por parte de las plantas, de modo que en suelos con pH ácido la materia orgánica se descompone más lentamente (Alcañiz et al., 2016; Arunrat et al., 2023; Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021).

La conductividad eléctrica, y por lo tanto, la salinidad, aumenta notablemente tras un incendio debido a la incorporación y solubilización de las cenizas. La liberación de los diversos iones podría suponer una mejora de la fertilidad del suelo, pero en muchos casos puede causar problemas en la absorción de algunos nutrientes, debido principalmente a alteraciones en el pH del suelo, o también a la formación de compuestos insolubles (Alcañiz et al., 2018; Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021).

En relación con los nutrientes, el nitrógeno (N) es uno de los nutrientes más afectados tras los incendios forestales. El nitrógeno total se pierde generalmente por volatilización debido a las temperaturas alcanzadas en el suelo (a partir de los 200 °C),

esto reduce drásticamente el contenido de nitrógeno en el suelo (Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021). El N es un elemento esencial para los seres vivos ya que forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos, por lo que es necesario el aporte de este nutriente al suelo para la recolonización por parte de la flora y fauna (Meena & Lal, 2018; Yuvaraj et al., 2020). Otros nutrientes como el fósforo (P), el magnesio (Mg), el calcio (Ca) y el potasio (K) pueden aumentar transitoriamente su cantidad disponible en el suelo, ya que son liberados por las cenizas, lo que aumenta su disponibilidad a corto plazo, aunque se pierden fácilmente por lavado, generando a medio y largo plazo una disminución severa de la fertilidad edáfica. Por otra parte, el carbono orgánico disminuye drásticamente en incendios de alta intensidad, aunque la magnitud de su disminución depende principalmente de la intensidad del fuego. Además se producen modificaciones en el humus que lo hacen más resistente a la degradación microbiana (Francos et al., 2023; Lorenzo et al., 2021; Salgado et al., 2024).

2.1.2. Efecto sobre la biodiversidad

El paso del fuego sobre el suelo afecta a los microorganismos y fauna presentes, reduciendo la diversidad y las poblaciones. Actúa de dos maneras: directamente a través del calentamiento del suelo ya que la mayoría de los hongos y las bacterias son extremadamente sensibles a las altas temperaturas, por lo que mueren (Alcañiz et al., 2018; Díaz-Raviña et al., 1996), o de forma indirecta al alterar las características del suelo como la cantidad de materia orgánica, el pH, la textura y la humedad del suelo. Algunas bacterias son resistentes a estas altas temperaturas, por lo que pueden llegar a sobrevivir y aumentar su abundancia, modificando así la composición de las diferentes especies presentes en el suelo (Fernández-García et al., 2021; Hu et al., 2023; Terribile et al., 2024).

La pérdida de biodiversidad en el suelo presenta consecuencias como la disminución de la fertilidad, una pérdida de la estructura del suelo, un aumento de las plagas y enfermedades o también la alteración de los ciclos biogeoquímicos entre otros.

2.1.3. Evolución y regeneración edáfica

En el proceso de regeneración edáfica, la deposición de las cenizas ricas en nutrientes puede incrementar la fertilidad del suelo, aunque es un efecto transitorio debido a la

lixiviación y erosión. En esta etapa las especies vegetales pioneras comienzan a colonizar el área ayudando a estabilizar el suelo y reducir así la erosión (Fernández-García et al., 2021; Mataix-Solera et al., 2009).

Posteriormente va aumentando la vegetación, comienza a acumularse materia orgánica en el suelo, mejorando su estructura y la capacidad para retener agua. También se produce un aumento de la actividad microbiana debido al acúmulo de materia orgánica. A medida que surgen estos procesos, la capa hidrofóbica que se formó en el suelo, va degradándose, permitiendo una mejor infiltración de agua y una reducción de la escorrentía superficial (Bárcenas-Moreno et al., 2016; Díaz-Raviña et al., 1996; Fernández-García et al., 2021; Lorenzo et al., 2021).

Por último se produce la reforestación natural o asistida por el hombre. Los arbustos comienzan dominando el paisaje, proporcionando una cubierta vegetal estable. Se van mejorando las propiedades físicas y químicas del suelo: los niveles de los diversos nutrientes se reestablecen, la estabilidad de los agregados incrementa paulatinamente, disminuye significativamente la erosión del suelo, gracias al establecimiento de la cobertura vegetal y el sistema de raíces principalmente (Fernández-García et al., 2021; Li et al., 2024).

2.2. Técnicas de recuperación de suelos quemados

Los procesos de recuperación, sin embargo, no siempre actúan con la velocidad adecuada, pudiendo dominar los procesos erosivos y la pérdida de suelo, limitando así las opciones de recuperación. Por esta razón, es necesaria la implementación de diversas técnicas que estabilicen el suelo y restauren la vegetación lo más rápido posible.

Una opción para controlar la erosión es la implementación de barreras físicas como por ejemplo paja, hojarasca o troncos, aunque también se pueden emplear otras actuaciones como diques. Estas actuaciones están encaminadas a disminuir la velocidad del agua ayudando a estabilizar el suelo reduciendo la erosión y mejorando la infiltración de agua (Fernández & Vega, 2016; Gómez-Rey et al., 2013; Prosdocimi et al., 2016).

Otra opción es la revegetación, a ser posible con especies nativas que estén adaptadas al ambiente en cuestión para restaurar la cubierta vegetal y mejorar la estructura del suelo. (Fernández-García et al., 2021; Gómez-Rey et al., 2013).

También se pueden aplicar enmiendas orgánicas. Por ejemplo: compost o estiércol para aumentar la materia orgánica disponible en el suelo y promover la actividad microbiana (Díaz-Raviña et al., 1996; Gómez-Rey et al., 2013). Es importante también la construcción de sistemas de drenaje como zanjas o terrazas, para controlar el flujo de agua y prevenir la erosión (Prosdocimi et al., 2016).

Si bien, las actuaciones se suelen utilizar de manera conjunta y complementaria para adecuar los distintos tipos de trabajos a las condiciones geográficas, geomorfológicas y la intensidad del incendio (Mataix-Solera & Guerrero, 2007).

2.2.1. Revegetación con leguminosas

Una de las técnicas empleadas de recuperación de suelos tras un incendio es la revegetación.

En las regiones templadas, como es el caso de España, las leguminosas son muy abundantes en las primeras etapas posteriores al incendio. Las pérdidas de nitrógeno causadas por los incendios pueden ser compensadas por la fijación de nitrógeno atmosférico. La importancia de esta familia radica en la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al establecer simbiosis mutualista estricta con bacterias denominadas *rhizobia* o rizobios (Meena & Lal, 2018; Peix et al., 2015).

Estas plantas presentan numerosas ventajas que las hacen idóneas para la recuperación de suelos, por ejemplo, mejoran la porosidad del suelo a través de sus raíces de forma directa pero también de forma indirecta ya que, los residuos ricos en nitrógeno de las leguminosas atraen a lombrices de tierra que crean galerías, aumentando la porosidad del suelo favoreciendo la circulación del aire y la infiltración del agua, disminuyendo la escorrentía superficial. También incrementan la estabilidad de los agregados del suelo, esto le confiere un aumento del espacio poroso y una mejora de la estructura. Además mejoran la capacidad de intercambio catiónico y la concentración de carbono orgánico en el suelo (Arneth et al., 2021; Meena & Lal, 2018; Yuvaraj et al., 2020).

Las leguminosas también contribuyen a la restauración de la materia orgánica del suelo en el momento en que se produce la senescencia foliar o la muerte de las plantas, aumentando la actividad y biodiversidad del suelo. Los microorganismos son capaces de descomponer el material vegetal con altos niveles de nitrógeno proveniente de las leguminosas. Una vez mueran estos descomponedores liberarán este el nitrógeno al suelo quedando disponible (Bekdouche et al., 2011; Yuvaraj et al., 2020).

El aporte de nitrógeno que proporciona el establecimiento de las leguminosas estimula la recuperación de la actividad microbiana y el ciclo del nitrógeno, lo que facilita la sucesión de las distintas comunidades vegetales y finalmente la recuperación del ecosistema a largo plazo. Las leguminosas son de las primeras especies vegetales en colonizar el suelo después del incendio, lo hacen de forma rápida y con una alta densidad y biomasa; además algunas presentan la capacidad de establecerse de manera exitosa en suelos pobres. A medida que la sucesión de especies se va produciendo, la abundancia de leguminosas va disminuyendo, pero tienen un papel clave en que el proceso de recolonización del suelo se lleve a cabo. Al ser de las primeras colonizadoras tienen otro papel muy importante: dificultan el establecimiento de especies exógenas (Arneth et al., 2021; Bekdouche et al., 2011; Yuvaraj et al., 2020).

En el caso del monte mediterráneo, las leguminosas presentan una destacada importancia biológica: por una parte, forman parte del estrato arbustivo dominando importantes superficies pudiendo encontrar especies de los géneros *Cystisus*, *Genista*, *Pterospartum*, *Retama* o *Ulex* entre otros. Por otro lado, destacan los siguientes géneros de especies herbáceas: *Trifolium*, *Lotus*, *Lupinus*, *Vicia*, *Medicago* o *Lathyrus*, que se distribuyen por la costa, las montañas y los bosques mediterráneos. La capacidad de adaptación de las especies de esta familia a las diversas condiciones ambientales es muy importante (Meena & Lal, 2018).

Para la restauración de la vegetación de suelos que han sufrido incendios, hemos optado en este trabajo por la introducción de estas tres especies de leguminosas: *Vicia villosa* Roth, *Lotus corniculatus* L. y *Lupinus angustifolius* L.

Vicia villosa, conocida comúnmente como veza, nativa de Europa y Asia Occidental, es una planta herbácea anual o bienal que crece en forma de enredadera con tallos débiles y rastreros de hasta 1,8 m de longitud. Tiene zarcillos en las puntas de las hojas para poder trepar. Tiene la capacidad de establecer simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. para poder fijar el nitrógeno atmosférico, enriqueciendo el suelo de este nutriente esencial. Es muy interesante la veza para la recuperación de suelos quemados porque además de tener la capacidad de establecer esta simbiosis, produce una gran cantidad de biomasa, ayudando a proteger el suelo de la erosión. También presenta raíces profundas y extensas que



Figura 1. Ilustración de *Vicia villosa*. Imagen recogida de (Thomé, 1885).

ayudan a mejorar la estructura del suelo. Tiene un crecimiento rápido y cubre densamente el suelo evitando el establecimiento de malezas. Tolera diferentes condiciones ambientales (suelos ácidos o alcalinos, tolerante a la sequía, suelos pobres nutrientes) que le permiten crecer en suelos afectados por incendios que son unas condiciones pobres para muchas otras plantas (Renzi et al., 2020; Yang et al., 2022).

Lotus corniculatus es nativa de Eurasia y del norte de África. Es una planta perenne que florece en primavera y verano. Tiene tallos delgados y ramificados de hasta 50 cm de altura. Es capaz de establecer simbiosis con bacterias del género *Mesorhizobium*. Es una importante planta forrajera que se utiliza para pastoreo. Presenta un sistema radicular extenso que ayuda a estabilizar el suelo controlando la erosión y permite la infiltración de agua y la aireación. Es capaz de establecerse rápidamente después de un incendio suprimiendo las malezas. Es muy tolerante a diferentes condiciones ambientales pudiendo establecerse en un suelo degradado post-incendio (Kramina et al., 2020; Marcos-García et al., 2015).

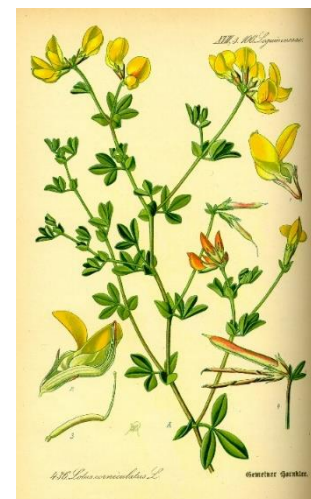


Figura 2. Ilustración de *Lotus corniculatus*. Imagen recogida de (Thomé, 1885).

Lupinus angustifolius es conocido como altramuz estrecho o lupino azul. Es originaria de la región mediterránea pero se cultiva en todo el mundo. Presenta tallos erectos que pueden alcanzar hasta 1,5 m de altura. Es una planta anual que florece en primavera y verano. Es tolerante a suelos ácidos, puede crecer en suelos pobres en nutrientes y además es resistente a la sequía. En este caso establece simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium* para la fijación de nitrógeno. Generalmente se utiliza como cultivo de cobertura para la protección del suelo de la erosión, mejorar la estructura y suprimir las malezas (Rejili et al., 2020).



Figura 3. Ilustración de *Lupinus angustifolius*. Imagen recogida de (Sweet et al., 1823)

2.3. Endosimbiontes nodulares de leguminosas

La asociación beneficiosa entre los rizobios y las leguminosas es conocida desde hace más de un siglo. Los rizobios son un grupo diverso de bacterias Gram negativas pertenecientes al filo *Pseudomonadota* capaces de inducir la formación de nuevos órganos en las raíces de algunas plantas leguminosas llamados nódulos; en estos órganos, los rizobios convierten el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados asimilables por las plantas. Por su parte, las plantas les proporcionan un ambiente favorable para su desarrollo, suministro de carbono y otros nutrientes esenciales para su actividad biológica (Peix et al., 2015).

El proceso de nodulación comienza con el reconocimiento de la leguminosa huésped por parte de la bacteria a través de la percepción de los flavonoides que secreta la planta por sus exudados radiculares. Se desencadena un diálogo molecular entre endosimbionte y huésped que finaliza con la formación del nódulo en las células del córtex de la raíz. Las bacterias entran en la planta y se dirigen al nódulo a través de canales de infección; una vez allí, se convierten en bacteroides. Estos bacteroides son los encargados de fijar el nitrógeno atmosférico (N_2). Este proceso es catalizado por la enzima nitrogenasa que requiere condiciones de microaerofilia; para lograr tales condiciones, las plantas sintetizan leghemoglobina, cuya función es unirse al oxígeno, creando un ambiente libre del mismo en el interior de los nódulos permitiendo la actividad de la enzima nitrogenasa. La acumulación de leghemoglobina en el interior

de los nódulos les proporciona un color rosado, indicando que están activos y fijando nitrógeno de manera efectiva (Oldroyd et al., 2011; Peix et al., 2015).

2.3.1. Diversidad y adaptación

Este grupo de los rizobios incluye bacterias con una importante diversidad genética. Aunque durante mucho tiempo se pensaba que estaba constituido por un escaso número de géneros dentro de α -Proteobacteria, hoy en día se sabe que incluye especies muy diferentes (Kuzmanović et al., 2022; Peix et al., 2015).

Cuando se propuso la utilización del gen ribosomal 16S como herramienta para la clasificación e identificación de bacterias, los rizobios pasaron a formar parte del filo Proteobacteria (Peix et al., 2015). La secuenciación de estos genes permitió la descripción de nuevas especies de rizobios de crecimiento rápido y lento que habían pasado desapercibidas. El gen 16S presenta un elevado grado de conservación y debido a esto muchas veces no es lo suficientemente discriminativo para diferenciar varias especies, por lo que incluyeron en el proceso de identificación otros genes, denominados *housekeeping* como son el *recA*, el *atpD* y el *glnII*. Por tanto, se han producido numerosas reclasificaciones: las especies de crecimiento lento fueron reclasificadas a un nuevo género: *Bradyrhizobium*. Posteriormente los géneros *Allorhizobium* y *Agrobacterium* se reclasificaron a *Rhizobium*. Por otro lado el género *Sinorhizobium* se reclasificó en *Ensifer* (Peix et al., 2015). En los últimos años, la taxonomía de la familia *Rhizobiaceae* ha sufrido importantes cambios, describiéndose numerosos géneros, que engloba a especies con capacidad noduladora y otros sin ella (Kuzmanović et al., 2022).

Los rizobios comprenden dos grupos: los “rizobios clásicos”, conformado únicamente por el género *Rhizobium* que se describió inicialmente como endosimbiontes de leguminosas aunque actualmente se sabe que está conformado por más géneros como: *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium* o *Bradyrhizobium* entre otros. El otro grupo son los “nuevos rizobios” formado por diferentes géneros como *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Devosia*, *Aminobacter*, *Ochrobactrum*, *Cupriavidus* o *Microvirga* entre otros, que no se reconocían como endosimbiontes pero, actualmente se sabe que algunas especies de este grupo son capaces de formar nódulos en leguminosas (Peix et al., 2015).

Un hecho a destacar fue el descubrimiento de géneros no pertenecientes a los rizobios capaces de formar nódulos en las leguminosas: *Methylobacterium* y *Burkholderia*. *Burkholderia*, se trata de la primera β -proteobacteria descrita como endosimbionte de una leguminosa. Este descubrimiento apoyó la hipótesis que se estaba barajando de que había transferencia horizontal de genes entre las distintas bacterias presentes en el suelo, ya que presentaba genes de nodulación pertenecientes a *Rhizobium* sp. (Peix et al., 2015). La transferencia horizontal de genes, como los *nod* o *nif*, permite la adquisición de nuevas capacidades simbióticas o también la adaptación a otros nichos ecológicos. Muchos rizobios tienen plásmidos que portan genes para la nodulación y la fijación de nitrógeno, que pueden ser transferidos de una bacteria a otra mediante la conjugación (Jiao et al., 2018; Rogel et al., 2011).

Además de los rizobios, en los nódulos de las leguminosas también se encuentran otras bacterias endofíticas. Estas bacterias ingresan al interior de los nódulos junto con los rizobios. Siempre fueron descartadas considerándose contaminantes a la hora de aislar los rizobios de los nódulos de las leguminosas; sin embargo, en los últimos años se ha comprobado como muchas de estas bacterias endófitas que colonizan el nódulo pueden tener un papel esencial en el crecimiento de las plantas (Peix et al., 2015).

2.3.2. Especificidad endosimbionte-huésped

La asociación mutualista entre el *rhizobia* y la leguminosa depende de la especificidad, infectividad y eficacia de la bacteria. El proceso de interacción tiene una serie de etapas en las que se expresan diferentes moléculas por parte de la bacteria, la planta hospedadora o ambas. La especificidad de esta simbiosis puede ocurrir en diversas fases de la interacción endosimbionte-huésped, desde la adhesión inicial de las bacterias hasta el desarrollo del nódulo y la fijación de nitrógeno (Ferguson et al., 2019; Peix et al., 2015).

Un punto de control de la simbiosis es la interacción flavonoide-NodD. Los NodD son los encargados de responder a los diferentes conjuntos de flavonoides secretados por las distintas plantas leguminosas. Este punto es muy sensible, ya que modificaciones en aminoácidos individuales pueden causar que no se proceda con el proceso de simbiosis. Sin embargo, algunos rizobios pueden presentar varias copias del gen *nodD* y esto les permite responder a diferentes tipos de flavonoides, ampliando su rango de

hospedadores. Así, algunos rizobios pueden tener un rango de hospedaje muy amplio. Por su parte, las leguminosas también presentan diferentes grados de promiscuidad. Algunas pueden ser noduladas por varias especies de rizobios, otras muchas son huéspedes restrictivos para la nodulación (Ferguson et al., 2019; Peix et al., 2015; Wang et al., 2012).

Asimismo, es importante mencionar también el término simbiovar., el cual sirve para agrupar las distintas cepas de una o varias especies capaces de establecer simbiosis con una determinada leguminosa en aquellas especies de rizobios en las que existen distintos grupos de cepas con distintos hospedadores. Para definir un simbiovar se utiliza el gen *nodC*. Se utiliza este gen porque la mayoría de los genomas de los rizobios presentan una copia única de este gen y presenta un grado de conservación bastante alto (Peix et al., 2015; Rogel et al., 2011).

Además de la eficiencia de la cepa bacteriana, la planta hospedadora regula la cantidad de nódulos que se forman en la raíz en función de diversos factores, como las concentraciones de nitrógeno en el suelo, las cuales, si son aptas para el desarrollo de la planta, reprimen la formación de nódulo por eficiencia energética. Además también influyen factores bióticos (plagas y pesticidas) y abióticos como son el pH, la temperatura, la salinidad, la sequía, metales pesados y pesticidas (Ferguson et al., 2019; Goyal et al., 2021).

3. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es estudiar el potencial de los endosimbiontes de leguminosas autóctonas en combinación con sus plantas hospedadoras para revegetar suelos quemados y mejorar su fertilidad. De acuerdo con este objetivo general, los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Aislar de endosimbiontes nodulares de *Vicia villosa*, *Lupinus angustifolius* y *Lotus corniculatus* en suelos quemados y no quemados de la provincia de Salamanca.
- Evaluar su potencial de adaptación a ambientes edáficos afectados por incendios de los aislados nodulares.

- Determinar la capacidad simbiótica de los aislados y su posible utilización como bioinoculantes de leguminosas autóctonas.
- Analizar la capacidad de los endosimbiontes nodulares seleccionados para mejorar junto con su planta hospedadora los procesos de revegetación en suelos quemados en condiciones de invernadero.

4. Materiales y métodos

4.1. Suelo quemado

Los suelos utilizados para este estudio fueron recogidos en varios puntos de la provincia de Salamanca. En el caso del suelo no quemado, se recogió de la zona de Los Montalvos (Figura 4). El tipo de suelo de esta zona presenta una textura franco arenoso arcillosa y la vegetación dominante en el suelo es *Quercus ilex* (Santiesteban et al., 1993). Por otro lado, los suelos quemados utilizados en este trabajo son dos (Figura 4). Ambos tienen una textura franca, que supone una mezcla uniforme de arena, arcilla y limo (Rodríguez et al., 1989). La vegetación en el suelo de tipo 1 antes del incendio estaba dominada por *Quercus pyrenaica* y en el suelo quemado de tipo 2 dominaba *Pinus pinaster*.

Tabla 1. Coordenadas pertenecientes a la toma de muestra junto con la nomenclatura para cada uno.

Suelo	Coordenadas	Nomenclatura
Suelo no quemado	40°55'55.0"N 5°44'31.7"W	MON
Suelo quemado tipo 1	40°32'55.2"N 6°14'01.6"W	MAF
Suelo quemado tipo 2	40°33'00.9"N 6°13'49.8"W	MAC

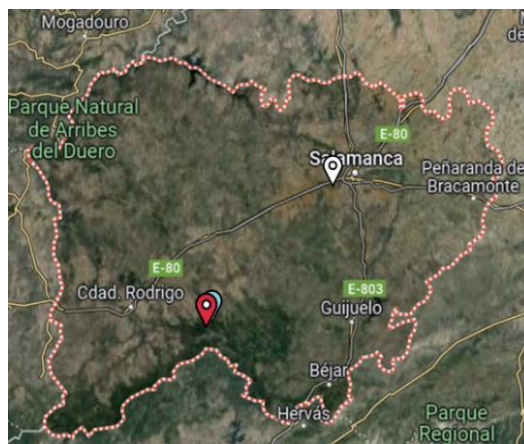


Figura 4. Mapa de la provincia de Salamanca. La localización marcada de color blanco indica el suelo no quemado, la de color rojo el suelo quemado tipo 1 y la de color azul el suelo quemado tipo 2.

4.2. Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de leguminosas

4.2.1. Esterilización semillas

La esterilización de las semillas utilizadas en este trabajo se llevó a cabo utilizando diferentes protocolos para cada tipo de semilla. Estos protocolos se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de esterilización de semillas utilizado para cada especie

Especie	H ₂ SO ₄	Etanol	Na ₂ ClO ₃	H ₂ O destilada
<i>Vicia villosa</i>		30"	10'	x5 lavados
<i>Lotus corniculatus</i>	12'	30"	10'	x5 lavados
<i>Lupinus angustifolius</i>		30"	5'	x5 lavados

4.2.2. Germinación semillas

Una vez esterilizadas, las semillas se germinaron en placas Petri de 90 mm de diámetro con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril durante 2 días en oscuridad a 20 °C.

4.2.3. Plantas trampa de endosimbiontes

Una vez germinadas las semillas, se procedió a preparar el ensayo de plantas trampa de endosimbiontes llevado a cabo en cámara iluminada utilizando recipientes de 1 l. Se colocaron 3 semillas de cada especie por recipiente y se emplearon 3 recipientes por cada tipo de suelo. El número total de plantas trampa empleadas por tipo de suelo fue de 9. Además, se incluyó un control negativo de nodulación en el que se utilizó vermiculita esterilizada previamente en autoclave durante 1 h a 120 °C de manera secuencial, repitiendo el proceso 3 días seguidos.

Las plantas se mantuvieron durante aproximadamente 40 días en cámara iluminada, con un 60 % de humedad relativa y programada con un fotoperiodo de 16 h de luz diarias y temperaturas de 25 y 17 °C durante el día y la noche, respectivamente. Periódicamente se regaron las plantas con agua destilada estéril. Al cabo de 40 días, se recogieron las plantas y se procedió al análisis de los nódulos obtenidos.

4.2.4. Esterilización de los nódulos

Para el aislamiento de bacterias a partir de los nódulos obtenidos en las diferentes plantas y suelos, primero se realizó una selección de los nódulos efectivos (color rosado). Los nódulos se esterilizaron en etanol durante 30", posteriormente se sumergieron en lejía al 10 % durante 2'. A continuación, se realizaron cinco lavados

con agua destilada estéril manteniendo condiciones asépticas, para retirar los restos de lejía. Una vez finalizados los lavados, se trituraron los nódulos con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, mediante la cual se procedió a la siembra del contenido de los diferentes nódulos en placas de YMA (Tabla 3). Las placas se incubaron en estufa a 28 °C hasta observar el crecimiento de colonias independientes. Una vez obtenidas las distintas colonias se realizaron diferentes aislamientos por agotamiento en estría para la obtención de cultivos puros.

Tabla 3. Composición del medio YMA

Medio YMA	
K ₂ HPO ₄ (Fluka™)	0,5 g
MgSO ₄ (Fluka™)	0,2 g
NaCl (Fluka™)	0,1 g
Manitol (Fluka™)	10 g
Extracto de levadura (Difco™)	0,2 g
Agar (Conda™)	20 g
Agua destilada, c.s.p.	1 l

4.3. Mantenimiento y conservación de las cepas

El mantenimiento de las cepas de uso rutinario se realizó en medio YMA (Tabla 3) a 4 °C. Por otra parte, se realizó la criopreservación de las cepas a – 80 °C realizando una suspensión celular en glicerol al 25 % en criotubos de 1 ml.

4.4. Caracterización genotípica

4.4.1. Extracción y purificación de ADN

Para la extracción de ADN, los diferentes aislados se cultivaron en medio TY (Tabla 4) durante 48 horas a 28 °C. Se utilizó el kit de REDEExtract-N-Amp™ PCR ReadyMix™ de Sigma siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recuperaron 100 µl del sobrenadante junto con 400 µl de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf nuevo conservándose a – 20 °C para la realización de ensayos moleculares.

Tabla 4. Composición del medio TY

Medio TY	
Cl ₂ Ca (Codex™)	0,9 g
Tryptona (Difco™)	5 g
Extracto de levadura (Difco™)	3 g
Agar	20 g
H ₂ O	1 l

4.4.2. Obtención de perfiles de RAPD

Para la obtención de perfiles de bandas de RAPD de las cepas se utilizó el primer M13 cuya secuencia se encuentra en la Tabla 9 del apartado 4.4.4. Los reactivos y condiciones de PCR utilizados se encuentran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Concentraciones de los reactivos de PCR para la

Reacción de PCR	
Perfiles de RAPD	
DreamTaq	10 µl
M13	2,5 µl
H ₂ O	6,5 µl
ADN molde	2 µl

Tabla 6. Condiciones de PCR utilizadas

		Obtención de perfiles RAPD
Predesnaturalización		95 °C
		9'
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C
		1'
	Anillamiento	45 °C
		1'
	Extensión	72 °C
		2'
Extensión final		72 °C
		7'

Para separar las diversas bandas amplificadas y obtener los perfiles de RAPD, el producto de PCR se sometió a electroforesis los productos de PCR obtenidos bajo las condiciones descritas en el apartado 4.4.3.

El análisis matemático de los perfiles se llevó a cabo con el programa Bionumerics (Applied Maths™, Nv; EEUU), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de construcción de dendrogramas UPGMA.

Tabla 7- Concentraciones de los reactivos de PCR para la amplificación de genes

Reacción de PCR	
DreamTaq	10 µl
Primer x2	2,5 µl
H ₂ O	5 µl
ADN molde	2 µl

Tabla 8. Condiciones de PCR utilizadas

		Amplificación del gen 16S	Amplificación de genes <i>housekeeping</i> / <i>nodC</i>
Predesnaturalización		95 °C	95 °C
		9'	9'
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C	94 °C
		1'	1'
	Anillamiento	55 °C	54 °C
		1' 30"	1'
	Extensión	72 °C	72 °C
		2'	2'
Extensión final		72 °C	72 °C
		7'	7'

4.4.3. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S (ARNr 16S)

La amplificación del gen ARNr 16S se llevó a cabo con los primers 27F y 1522R cuya secuencia se indica en la Tabla 9 del apartado 4.4.4, utilizando la polimerasa DreamTaq (ThermoFisher) en las condiciones de PCR que se muestran en las Tablas 7 y 8.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1 %. El tampón utilizado para la elaboración de los geles y para la electroforesis fue el TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8, Sigma Aldrich). Se empleó GeneRuler 1kb ladder (ThermoFisher™) como marcador de pesos moleculares. La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm y utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad™, EEUU). Para la observación de las bandas resultantes en el gel de agarosa, se incorporó Midori Green a una concentración de 0.04 µg/ml y se fotografiaron con luz U.V. mediante el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad™, EEUU).

Una vez comprobado mediante electroforesis que efectivamente el producto de la PCR era el gen ARNr 16S, se procedió a la purificación del producto de PCR utilizando el kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific™) siguiendo el protocolo comercial.

La secuenciación del gen ARNr 16S se llevó a cabo en el servicio de secuenciación SANGER de Macrogen España. Para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico ARNr 16S se utilizaron diferentes primers, el 800R y el 1492R, mostrados en la tabla 9 del apartado 4.4.4 junto con su secuencia. Los fragmentos de la secuencia del gen obtenidos se ensamblaron mediante el programa SeqMan II.

4.4.4. Amplificación y secuenciación de genes *housekeeping* y *nodC*

Se realizó la secuenciación del gen *atpD* mediante los primers *atpD*-3R y *atpD*-1F, cuya secuencia se muestra en la Tabla 9, a las concentraciones de reactivos mostradas en la Tabla 7 del apartado 4.4.3 y con las condiciones de PCR mostradas en la tabla 8. Los productos obtenidos se purificaron utilizando el protocolo descrito en el apartado 4.4.3. Asimismo, para la secuenciación del gen *glnII* se utilizaron los primers *glnIIF* y *glnIIR* (Tabla 9), en las mismas concentraciones y condiciones utilizadas para el gen *atpD*.

La amplificación de los genes *nodC* se llevó a cabo utilizando los primers indicados en la Tabla 9. Las concentraciones de reactivos se muestran en la Tabla 7 del apartado 4.4.3 y las condiciones de PCR en la Tabla 8. Los productos obtenidos se purificaron y secuenciaron igual que en el apartado 4.4.3.

Tabla 9. Primers utilizados

Primer	Secuencia	Autores
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	(Rivas et al., 2007)
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'	(Rivas et al., 2007)
800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'	(Chávez et al., 2013)
1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	(Turner et al., 1999)
atpD- 1F	5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT- 3	(Gaunt et al., 2001)
atpD-3R	5'-GCCGACACTTCCGAACCNCGCTG- 3'	(Gaunt et al., 2001)
nodCI	5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3'	(Laguerre et al., 2001)
nodCF	5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3'	(Laguerre et al., 2001)
nodCBF	5'-CGCAAGGCGCAG(AT)TCGC-3'	(Velázquez et al., 2010)
nodCBR	5'-GG(GT)GTG(AGC)AGCG(AC)GAAGCCG-3'	(Velázquez et al., 2010)
glnIIF	5'-AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG-3'	(Stępkowski et al., 2005)
glnIIR	5'-SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTGCG-3'	(Stępkowski et al., 2005)
M13	5'-CAGGGTGGCGGTTCT-3'	(Schönian et al., 1993)

4.4.5. Análisis de las secuencias de ADN

El análisis de las secuencias de los genes cromosómicos *16S*, *atpD*, *glnII* y del gen simbiótico *nodC* se llevó a cabo utilizando el programa NCBI BLAST versión 2.0, que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de genes y nos ofrece un listado de aquéllas que presentan una mayor similitud (Johnson et al., 2008) Para el análisis filogenético, las secuencias de las cepas del estudio junto con las de las cepas de referencia próximas a cada una de ellas, se alinearon mediante el programa Clustal X (Jeanmougin et al., 1998; Thompson et al., 1997) y, con el programa Mega 11.0 (Tamura, Stecher, and Kumar, 2021), se construyeron los árboles filogenéticos, utilizando el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987), y el coeficiente de Kimura 2 parameters (Kimura, 1980), seleccionando un “bootstrap” de 1000.

4.5. Ensayo de nodulación en cámara de cultivo

Para la realización del ensayo de nodulación se esterilizaron las semillas siguiendo el protocolo indicado en el apartado 4.2.1. Una vez germinadas se trasplantaron a vermiculita estéril. La vermiculita fue previamente lavada y esterilizada en autoclave en las mismas condiciones ya mencionadas en el apartado 4.2.3. Para este ensayo se utilizaron recipientes de 1 l para las especies de *V. villosa* y *Lu. angustifolius*, y de 0.25

1 para *Lo. corniculatus*. En el caso de las especies *V. villosa* y *Lu. angustifolius* se sembraron 3 semillas por recipiente, y 5 semillas por recipiente para *Lo. corniculatus*.

Para cada ensayo se realizó un control negativo (sin aporte de nitrógeno) que se regó con solución de Rigaud y Puppo (Tabla 10), un control positivo (se regó con la misma solución nutritiva suplementada con 0,4 g/l de NH_4NO_3), un control positivo de nodulación inoculado con una cepa de referencia y capacidad de nodulación comprobada (se regó con la solución de Rigaud y Puppo).

Tabla 10. Composición de la solución nutritiva Rigaud y Puppo.

Solución nutritiva Rigaud y Puppo	
KH_2PO_4 (Panreac TM)	0,200 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac TM)	0,200 g/l
KCl (Panreac TM)	0,200 g/l
EDTA Fe Na_2 (Sigma TM)	0,025 g/l
Na_2MoO_4 (Panreac TM)	0,004 g/l
H_3BO_3 (Panreac TM)	0,018 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Panreac TM)	0,020 g/l
ZnSO_4 (Panreac TM)	0,003 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac TM)	0,002 g/l

Para la preparación de los inóculos, se crecieron las cepas en medio YMA durante 5 días. Se realizó una suspensión celular de cada una de las cepas seleccionadas en agua destilada estéril con una DO. a 600nm de 2 equivalente a una concentración de 10^9 UFC/ml. Se inoculó un mililitro de suspensión por cada semilla. El ensayo se desarrolló en cámara iluminada en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 4.2.3, durante 30 días. Una vez pasado este tiempo, se procedió a retirar las plantas, se recontó el número de nódulos de cada una de ellas, y se midieron el peso fresco y el peso seco, para esto último las plantas se secaron en una estufa a 100°C hasta peso constante.

4.6. Ensayos en invernadero

Los ensayos de invernadero se realizaron en las instalaciones pertenecientes al Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE). Se llevaron a cabo utilizando suelo quemado como sustrato procedente de la localización 1 que habían sufrido incendios forestales y se inocularon las cepas seleccionadas en base a los

resultados obtenidos en el ensayo anterior en cámara iluminada. En este caso las semillas se esterilizaron previamente tal y como está descrito en el apartado 4.2.1.

La preparación de las suspensiones e inoculación de las semillas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.5. Las plantas fueron recogidas 30 días después de su inoculación, una vez pasado este tiempo se retiraron del sustrato y se analizaron parámetros vegetativos y fisicoquímicos como peso fresco, peso seco y número de nódulos.

Por otra parte, se realizó el análisis de nitrógeno en el servicio de Análisis e Instrumentación del IRNASA-CSIC (Salamanca) para proceder a determinar la eficiencia simbiótica de los aislados empleados como inoculantes.

5. Resultados y Discusión

5.1. Aislamiento de endosimbiontes a partir de plantas trampa

Las cepas bacterianas fueron aisladas a partir de nódulos efectivos de las tres especies empleadas en este trabajo que presentaban un color rosáceo. Las colonias con apariencia mucosa y con una tonalidad ligeramente transparente o blanquecina se aislaron en medio YMA.

En primer lugar, a partir de Lotus (Lo) corniculatus se obtuvieron 13 cepas aisladas a partir de 6 nódulos obtenidos en el suelo de bosque no quemado (Tabla 11). En el caso del suelo quemado tipo 1 se obtuvieron 13 cepas aisladas a partir de 15 nódulos (Tabla 11). Sin embargo, en el suelo quemado tipo 2 no se obtuvieron nódulos en las plantas trampa. Los nódulos de Lo. corniculatus como se puede ver en la Figura 5 tienen una forma esférica debido a que son nódulos determinados (Marcos García, 2017).

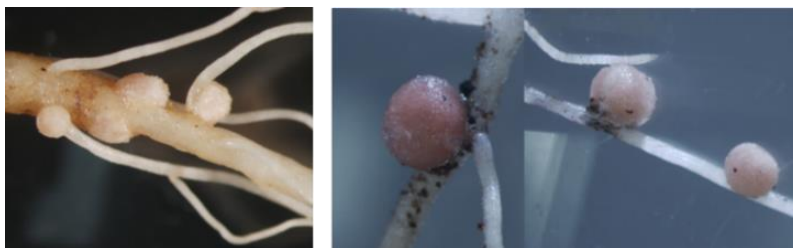


Figura 5. Imágenes de los nódulos obtenidos en *Lo. corniculatus*. La imagen de la izquierda se corresponde con los nódulos obtenidos en el suelo control. La imagen de la derecha corresponde a los nódulos formados en el suelo quemado tipo 1

En el caso de *Lupinus (Lu) angustifolius* se obtuvieron 10 cepas aisladas a partir de 12 nódulos en el caso del suelo de bosque no quemado (Tabla 11). Estos nódulos presentaban una morfología típica de nódulos de *Lupinus*, formando grandes agrupaciones sobre la raíz principal (Figura 6). Los nódulos seleccionados en el suelo quemado tipo 1 fueron un total de 14 consiguiéndose aislar 5 cepas (Tabla 11). También se aislaron un total de 4 cepas procedentes de 7 nódulos de las plantas de suelo quemado tipo 2 (Tabla 11). Los nódulos de *Lu. angustifolius* a pesar de tener una forma esférica son nódulos indeterminados y presentan una corteza gruesa, (González-Sama et al., 2006), esta condición no permite observar la coloración rosada típica de los nódulos efectivos, pero si presentaban la coloración en su interior.



Figura 6. Imágenes de los nódulos obtenidos en *Lu. angustifolius*. La imagen de la izquierda se corresponde con los nódulos obtenidos en el suelo control. En el medio suelo quemado tipo 1. A la derecha suelo quemado tipo 2

Por último, de la especie *Vicia (V.) villosa* solamente obtuvimos nódulos en el suelo control. Aislamos un total de 14 cepas a partir de 20 nódulos (Tabla 11). En ninguno de los dos suelos quemados esta planta fue capaz de nodular. En la Figura 7 se observan los nódulos son un color rosado en su interior, al igual que *Lu. angustifolius* también son de tipo indeterminado y presentan una morfología más alargada

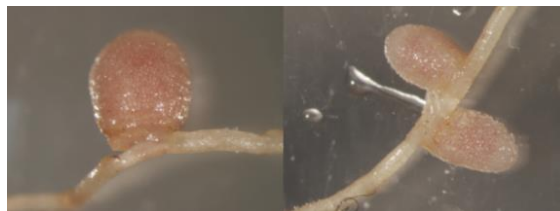


Figura 7. Imágenes de los nódulos obtenidos en *Vi. villosa*. Ambas imágenes se corresponden con los nódulos obtenidos en el suelo control.

Estos datos parecen indican que estas plantas, de manera natural pueden tener dificultades para nodular en condiciones post-incendio, probablemente por la ausencia de endosimbiontes competentes con los que establecer la simbiosis, reforzando la necesidad de buscar estrategias de nodulación adecuadas

Tabla 11. Cepas de *rhizobia* aisladas a partir de las tres leguminosas empleadas en este estudio en relación con el tipo de suelo empleado

Tipo de suelo	Hospedador	Cepa
Suelo monte	<i>Lotus corniculatus</i>	MONLC01,MONLC02,MONLC03,MONLC04,MONLC05,MONLC06, MONLC07,MONLC08,MONLC09,MONLC10,MONLC11, MONLC13
	<i>Vicia villosa</i>	MONVS01,MONVS03,MONVS04,MONVS05,MONVS07,MONVS08, MONVS09,MONVS10,MONVS11,MONVS12,MONVS13,MONVS16, MONVS18,MONVS19
	<i>Lupinus angustifolius</i>	MONLA02,MONLA03,MONLA04,MONLA06,MONLA07,MONLA09, MONLA13, MONLA14,MONLA15
Suelo quemado tipo 1	<i>Lotus corniculatus</i>	MAFLC01,MAFLC02,MAFLC04,MAFLC05,MAFLC06,MAFLC08, MAFLC09,MAFLC12,MAFLC14,MAFLC15,MAFLC16,MAFLC17
	<i>Lupinus angustifolius</i>	MAFLA01,MAFLA02,MAFLA03,MAFLA04 MAFLA07
Suelo quemado tipo 2	<i>Lupinus angustifolius</i>	MACLA02,MACLA05,MACLA07,MACLA09

5.2. Análisis de la biodiversidad mediante perfiles de RAPD

El análisis mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permite estudiar variabilidad en los genomas sin un conocimiento previo de los mismos, analizando de esta forma la diversidad entre las diferentes cepas a estudiar.

Tabla 12. Distribución de las cepas según los tipos de perfiles M13-RAPD. En negrita, las cepas seleccionadas como representantes de cada grupo

RAPD	Cepas
LA1	MONLA03, MONLA14, MONLA06
LA2	MAFLA02
LA3	MAFLA03
LA4	MONLA02, MONLA04
LA5	MONLA09 , MONLA13
LA6	MONLA15
LA7	MAFLA07
LA8	MONLA07
LA9	MACLA09 , MACLA02, MACLA05, MAFLA01, MACLA07
LA10	MAFLA04
VS1	MONVS16, MONVS18, MONVS12, MONVS13, MONVS04, MONVS09
VS2	MONVS08 , MONVS10
VS3	MONVS11 , MONVS19, MONVS07
VS4	MONVS05
VS5	MONVS01, MONVS03
LO1	MONLC06, MONLC13 , MONLC03, MONLC05, MONLC04
LO2	MONLC07, MONLC08, MONLC11, MONLC02, MONLC09,MONLC10, MONLC01
LO3	MAFLC07, MAFLC12, MAFLC01 , MAFLC05
LO4	MAFLC06 , MAFLC13
LO5	MAFLC02, MAFLC08, MAFLC14 , MAFLC15, MAFLC16, MAFLC17
LO6	MAFLC04 , MAFLC09

Los resultados obtenidos después del análisis matemático de los perfiles de RAPD de las 57 cepas de rizobios aisladas en este trabajo se muestran en las Figuras 8,9 y 10. En el caso de los endosimbiontes procedentes de *Lu. angustifolius*, éstos se agruparon en 10 grupos diferentes, la mayoría de ellos integrados por 1 o 2 cepas diferentes como se observa en la Figura 8 y Tabla 12.

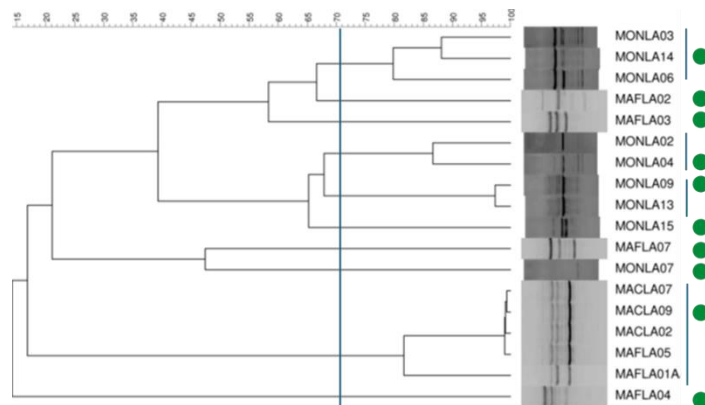


Figura 8. Dendrograma resultante de la agrupación de los perfiles de RAPD de las cepas de *Lu. angustifolius* utilizando el coeficiente de Pearson y un 70%. En verde se indican los representantes de cada grupo.

Con respecto a los aislados procedentes de plantas de veza, se obtuvieron 5 grupos diferentes, la mayoría de ellos compuestos por diversas cepas salvo el grupo VS4 compuesto únicamente por la cepa MONVS05. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9 y la tabla 12.

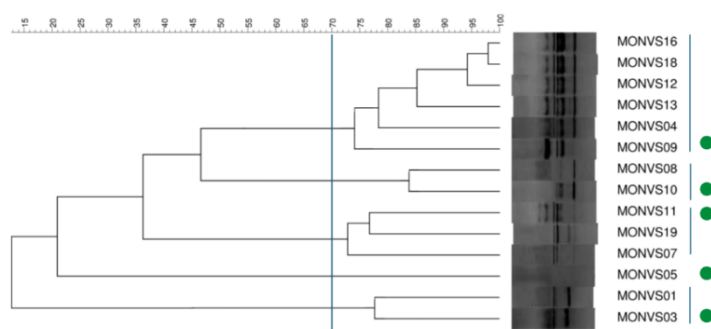


Figura 9. Dendrograma resultante de la agrupación de los perfiles de RAPD de las cepas de *V. villosa* utilizando el coeficiente de Pearson y un 70%. En verde se indican los representantes de cada grupo.

Los 26 aislados de *Lo. corniculatus* se agruparon en 6 grupos diferentes, integrados por entre 2 y 7 cepas diferentes (Figura 10, Tabla 12). También se observa una diferenciación clara entre los aislados de ambas localizaciones.

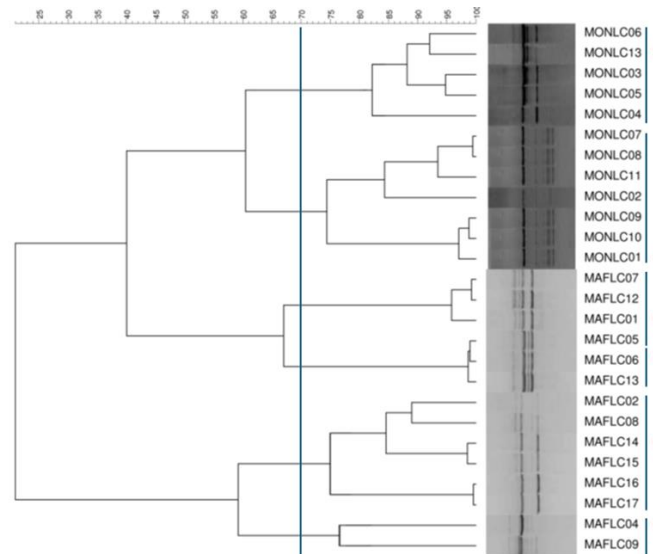


Figura 10. Dendrograma resultante de la agrupación de los perfiles de RAPD de las cepas de *Lo. corniculatus* utilizando el coeficiente de Pearson y un 70% de similitud. En verde se indican los representantes de cada grupo seleccionados.

Estos resultados muestran que, en relación con el número de cepas obtenido, la variabilidad es elevada, mostrando cómo las leguminosas de este estudio son capaces de establecer simbiosis con diversos fondos genéticos.

5.3. Identificación de las cepas aisladas

Para llevar a cabo la identificación mediante la secuenciación del gen ribosómico 16S se seleccionó un representante de cada grupo de RAPD. Los resultados del análisis de este gen se muestran en la tabla 13.

El análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de aquellas cepas identificadas dentro del género *Rhizobium* se muestra en la Figura 11. Este análisis nos muestra que los aislados se agrupan en diferentes clados. Por un lado, se encuentra la secuencia de la cepa MONLA07, que tiene un 100 % de similitud con la de la cepa tipo de *R. brockwellii* CC275e^T (Tabla 13), y aparece en un clado junto con esta y varias otras cepas tipo del género *Rhizobium* (Figura 11). Las secuencias de las cepas MONVS05, MONVS09, MONVS10 y MONVS11 forman un clado independiente con un porcentaje de similitud entre el 99,33 % y el 99,96 % respecto a la secuencia del gen 16S de las cepas tipo que conforman el grupo de *R. leguminosarum* LMG 14904^T

sensu stricto (Figura 11, Tabla 13). Estas serían: *R. brockwellii* CC275e^T, *R. sophorae* LMG 27901^T, *R. anhuiense* CCBAU 23252^T, *R. indicum* JKLM 12A2^T, *R. ruizarguesonis* UPM1133^T, *R. indigoferae* CIP 108029^T, *R. laguerreae* FB206^T, *R. beringeri* SM51^T, *R. jonhstonii* 3841^T y *R. redzepovicii* 18^T. La secuencia de la cepa MACLA09 presenta un 99,51 % de similitud con la secuencia de la cepa tipo de *R. mayense* CCGE26^T (Tabla 13), aunque se agrupa en una rama independiente del árbol filogenético (Figura 11). Las secuencias de las cepas MAFLA02, MAFLA03, MAFLA04, y MAFLA07 aparecen agrupadas en el árbol en un mismo clado, separado de las cepas tipo de especies descritas, y presentan porcentajes de similitud entre 99,64 % y 99,78 % con las secuencias de las cepas tipo de *R. rhizogenes* ATCC 11325^T, *A. rubi* ICMP 11833^T, *R. lusitanum* P1-7^T y *R. leucaenae* LMG 9517^T (Figura 11, Tabla 13). Por último, la secuencia de la cepa MONLA09 presenta un 100% de similitud con la secuencia de la cepa tipo de *R. alarii* GBV016^T, con la que se agrupa en una rama dentro del árbol filogenético, confirmando su afiliación filogenética (Tabla 13).

Tabla 13. Relación de las secuencias del gen ARNr 16S y su similitud con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas

Cepa	Especie más próxima	Nº de acceso	Identidad (%)
MONVS03	<i>Phyllobacterium loti</i> S658 ^T	NR 133818.1	98,29
MONVS05	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275e ^T	CP053439.3	99,71
MONVS08	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275e ^T	CP053439.4	99,71
MONVS09	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275e ^T	CP053439.4	99,84
MONVS11	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275e ^T	CP053439.6	99,71
MONLA04	<i>Bradyrhizobium lupini</i> USDA 3051 ^T	NR 134836.1	99,85
MONLA06	<i>Bradyrhizobium lupini</i> USDA 3051 ^T	NR 134836.2	99,85
MONLA07	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275e ^T	CP053439.8	100
MONLA09	<i>Rhizobium alarii</i> GBV016 ^T	NR 042687.1	100
MONLA14	<i>Bradyrhizobium lupini</i> USDA 3051 ^T	NR 134836.3	99,93
MONLA15	<i>Mesorhizobium norvegicum</i> 10.2.2 ^T	NR 170463.1	99,77
MONLC01	<i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075 ^T	NR 074209.1	99,7
MONLC13	<i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075 ^T	NR 074209.3	99,84
MAFLA02	<i>Caballeronia udeis</i> Hg2 ^T	MN727307.1	99,04
MAFLA03	<i>Rhizobium panacihumi</i> DCY116 ^T	KY996486.2	97,9
MAFLA04	<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	NR 104207.1	99,78
MAFLA07	<i>Paraburkholderia nemoris</i> LMG 31836 ^T	NR_178458.1	99,65
MAFLC01	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11 ^T	NR 116360.2	99,93
MAFLC04	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11 ^T	NR 116360.3	99,07
MAFLC06	<i>Bradyrhizobium rifense</i> CTAW71 ^T	NR 116361.2	100
MAFLC14	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> CTAW11 ^T	NR 116360.3	99,14
MACLA09	<i>Rhizobium mayense</i> CCGE526 ^T	NR 109703.1	99,51

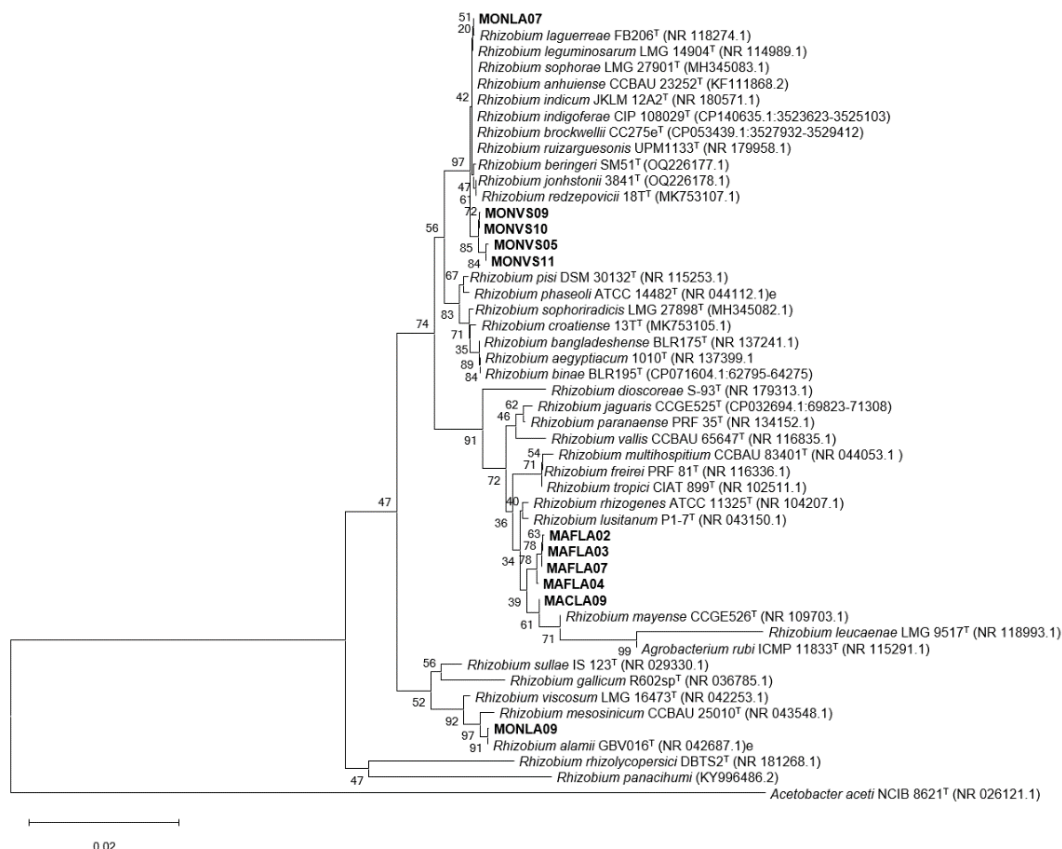


Figura 11. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este trabajo pertenecientes al género *Rhizobium* y las especies más cercanas descritas en el género, realizado mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros

En la Figura 12 se encuentra representado el árbol filogenético correspondiente a los géneros *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*. En cuanto a los aislados del género *Mesorhizobium*, las cepas MONLC01 y MONLC13 se agrupan con la cepa tipo de *M. opportunistum* WSM2075^T, con la que presentan respectivamente un grado de similitud de 99,7 % y 99,84 % en la secuencia del gen ARNr 16S, mientras que la cepa MONLA15 se agrupa con las cepas tipo de *M. norvergicum* 10.2.2^T y *M. loti* NBRC 14779^T, con las que presenta un porcentaje de similitud del 99,77 % y el 99,76 %, respectivamente (Figura 12, Tabla 13). En cuanto al género *Phyllobacterium*, la secuencia de la cepa MONVS03 presentó un 98,29 % de similitud con respecto de la secuencia de la cepa tipo de *Phyllobacterium loti* S658^T, aunque se agrupa en una rama independiente del árbol (Figura 12, Tabla 13).

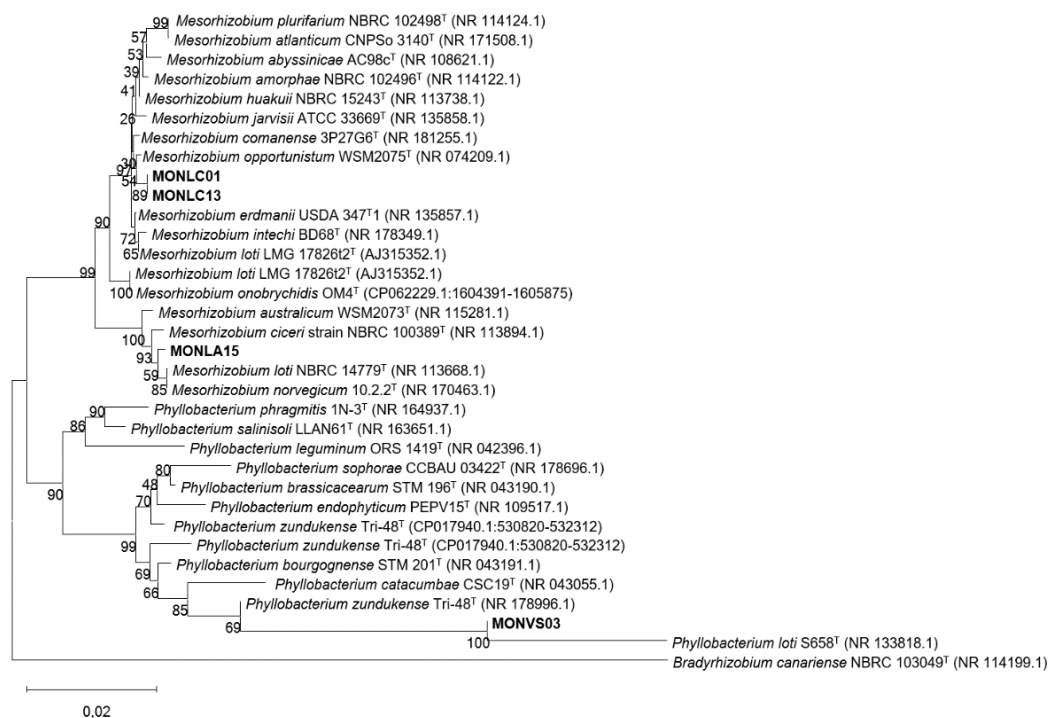


Figura 12. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este trabajo pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*, junto con las especies más cercanas descritas en ambos géneros, realizado mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros

Las relaciones filogenéticas de las cepas aisladas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* se muestran en la Figura 13. En primer lugar, las secuencias de las cepas MONLA02, MONLA06 y MONLA14 mostraron un porcentaje de similitud de entre el 99,85 % y el 99,93 % con la cepa tipo de *B. lupini* USDA 3051^T que conforma un clado junto con *B. canariense* NBRC 103049^T, con la que comparten porcentajes de similitud del 99,03 %. Por otro lado, la cepa MAFLC06 presenta una similitud de secuencia del 100% y 99,90 % con la secuencia del gen 16S de las cepas *B. cytisi* CTAW11^T y *B. rifense* CTAW71^T, respectivamente, formando un clado con ambas cepas tipo. En último lugar, las secuencias de las cepas MAFLC01, MAFLC04, y MAFLC14 presentan una similitud con la cepa tipo de *B. cytisi* CTAW11^T de entre el 99,07 % y el 99,93 %, pero aparecen en un clado diferente dentro del árbol (Figura 13, Tabla 13).

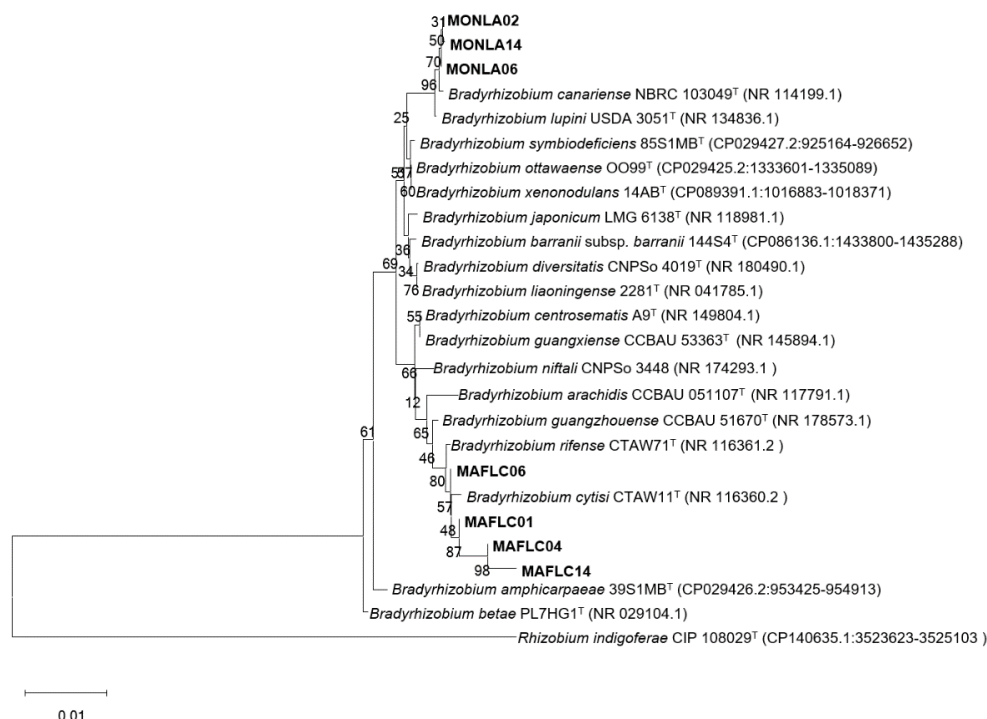


Figura 13. Análisis filogenético del gen ARNr 16S de los aislados de este trabajo pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, junto con las especies más cercanas descritas en el género, realizado mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros.

Como se ha podido observar, el gen ARNr 16S no permite una buena discriminación entre distintas especies de los géneros estudiados y no queda clara la identificación de la mayoría de los aislados a nivel de especie. Por ello, se procedió a la amplificación de diferentes genes “housekeeping” en función de la idoneidad y posibilidad de identificación para cada uno de los géneros identificados (Villadas et al., 2017; Vinuesa et al., 2005). De esta manera, se amplificó el gen *atpD* para los aislados pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*, además del aislado MONLA04 perteneciente al género *Bradyrhizobium*. La identificación de las cepas mediante el gen *atpD* se muestra la tabla 14.

En la Figura 14 se encuentra representado el árbol filogenético correspondiente al género *Rhizobium*. Las cepas MONVS05, MONVS09, MONVS10 y MONVS11 forman un clado junto con *R. laguerreae* FB206^T, con la que comparten un 100 % de similitud en la secuencia del gen *atpD*. Estos resultados parecen confirmar que las MONVS05, MONVS09, MONVS10 y MONVS11 se identifican como *R. laguerreae*. Por otro lado, la cepa MONLA07 conforma un clado junto *R. brockwellii* CC275e^T, con la que presenta una similitud del 98 % en la secuencia del gen *atpD*. Estos datos parecen confirmar la afiliación de cepa a la especie *R. brockwellii*. La cepa MAFLA03

forma un clado con *R. flavescens* FML-4^T, con la que presenta una similitud en la secuencia del gen *atpD* del 91,02 % (Tabla 14), lo que confirma la identificación de MAFLA03 dentro de la especie *R. flavescens*. La cepa MAFLA01 conforma un clado junto con *R. lusitanum* p1^T, con la que presenta una similitud de secuencia del gen *atpD* del 95,47 %, lo que muestra que la cepa MAFLA01 puede identificarse como *R. lusitanum*. Por último, la cepa MAFLA04 presenta una secuencia del gen *atpD* con una alta diferencia con las secuencias de cepas tipo de especies descritas y aparece en una rama independiente del árbol, lo que sugiere que podría constituir una nueva especie.

Tabla 14. Relación de las secuencias del gen *atpD* y su similitud con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas

Cepa	Especie más próxima	Nº de acceso	Identidad (%)
MONLC06	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 ^T	BA000012.4:3245449-3246882	96,83
MONVS03	<i>Phyllobacterium trifolii</i> PETP02 ^T	JN848779.1	96,13
MONVS05	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	JN558661.1	100
MONVS09	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	JN558661.1	99,77
MONVS10	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	JN558661.1	100
MONVS11	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	JN558661.1	99,48
MONLA04	<i>Bradyrhizobium canariense</i> LMG 22265 ^T	FM253135.1	100
MONLA07	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275e ^T	CP053439.1	98
MAFLA01	<i>Rhizobium lusitanum</i> p1-7 ^T	DQ431671.1	95,47
MAFLA03	<i>Rhizobium flavescens</i> FML-4 ^T	MT210415.1	91,02
MAFLA04	<i>Rhizobium lusitanum</i> p1-7 ^T	DQ431671.1	95,71

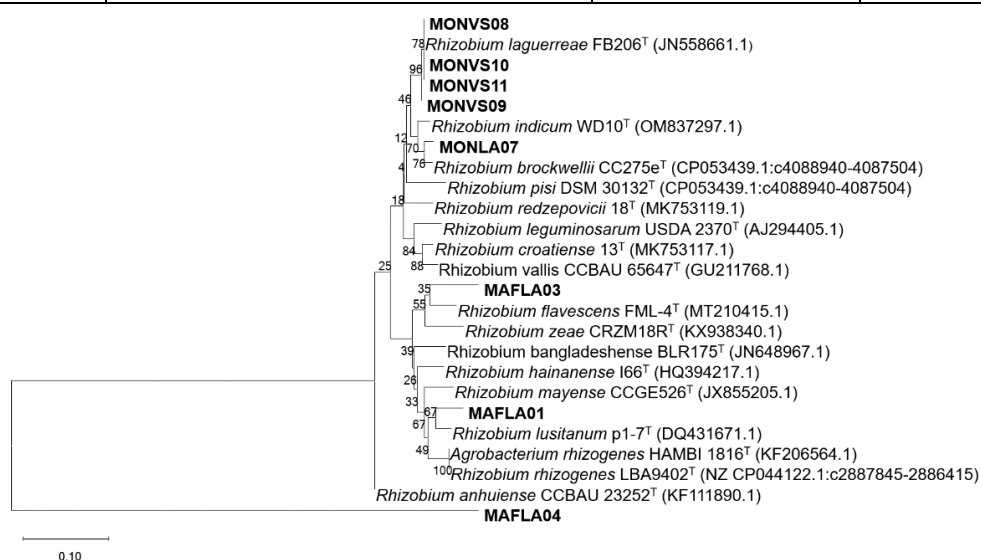


Figura 14. Análisis filogenético del gen *atpD* de los aislados de este trabajo pertenecientes al género *Rhizobium*, junto con las especies más cercanas descritas del género realizado mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros.

En la Figura 15 se encuentra el árbol filogenético relativo a los géneros *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*. Dentro del género *Mesorhizobium*, las cepas MONLC01 y MONLC13 presentan una similitud del 96,83 % y 96.74%, respectivamente, con la secuencia del gen *atpD* de la cepa tipo de *M. loti* MAFF303099^T (Tabla 14); sin embargo, estas cepas aparecen en una rama independiente del árbol filogenético (Figura 15), por lo que podrían constituir nuevas especies. Habría que confirmarlo mediante la secuenciación de otros *housekeeping* o la secuenciación y análisis de su genoma. En segundo lugar, la secuencia de la cepa MONVS03 presentó un 96,13 % de similitud con respecto de la secuencia de la cepa tipo de *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T (Tabla 14), pero aparece en una rama del árbol totalmente independiente, lo que sugiere que esta cepa podría constituir una nueva especie dentro del género.

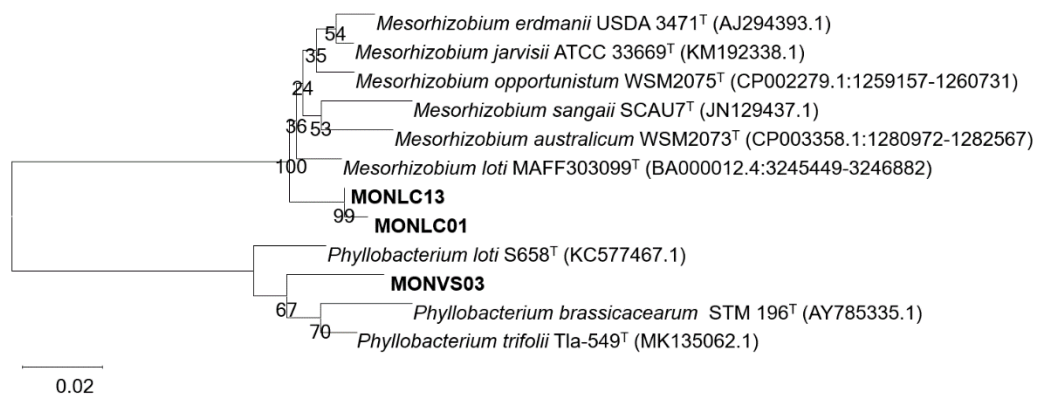


Figura 15. Análisis filogenético del gen *atpD* de los aislados de este trabajo pertenecientes al género *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*, junto con las especies más cercanas descritas en ambos género. Mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros

En el caso de las cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* (Figura 16), la cepa MONLA04 muestra una similitud del 100 % con la secuencia del gen *atpD* de la cepa tipo *B. canariense* LMG 22265^T (Tabla 14), con la que se agrupa dentro del árbol filogenético, lo que parece indicar la identificación de nuestra cepa dentro de la mencionada especie. Para el resto de aislados de este género, no se consiguió amplificar el gen *atpD*; este gen presenta una alta variabilidad e incluso varias copias de este en un mismo genoma por lo que su amplificación genera problemas (Flores-Félix et al., 2023), sin embargo, no fue posible amplificarlo para todas las cepas pertenecientes a este género y se utilizó el gen *glnII* para los aislados MAFLC.

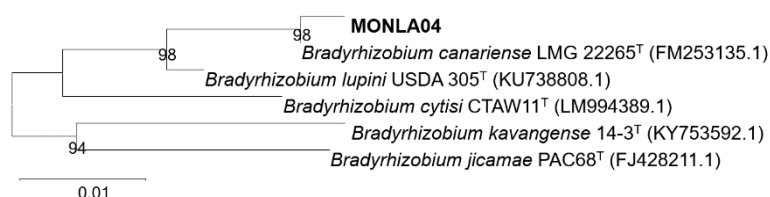


Figura 16. Análisis filogenético del gen *atpD* de la cepa MONLA04 perteneciente al género *Bradyrhizobium*, junto con las especies más cercanas descritas en el género. Mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros.

De esta manera se observó que la secuencia del gen *glnII* obtenida para los aislados MAFLC01, MAFLC04, MAFLC06 y MAFLC14 presentaba un porcentaje de similitud de entre el 99,38% y el 99,21% con la secuencia de la cepa tipo de *B. cytisi* (Tabla 15); además, las tres cepas se agrupan en el árbol filogenético con *B. cytisi* LMG 25866^T, confirmando la identificación en esta especie (Figura 17).

Tabla 15. Relación de las secuencias del gen *atpD* y su similitud con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas

Cepa	Especie más próxima	Nº de acceso	Identidad (%)
MAFLC01	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> LMG 25866 ^T	JN186291.1	99,37
MAFLC04	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> LMG 25866 ^T	JN186291.1	99,69
MAFLC06	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> LMG 25866 ^T	JN186291.1	99,53
MAFLC14	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> LMG 25866 ^T	JN186291.1	99,53

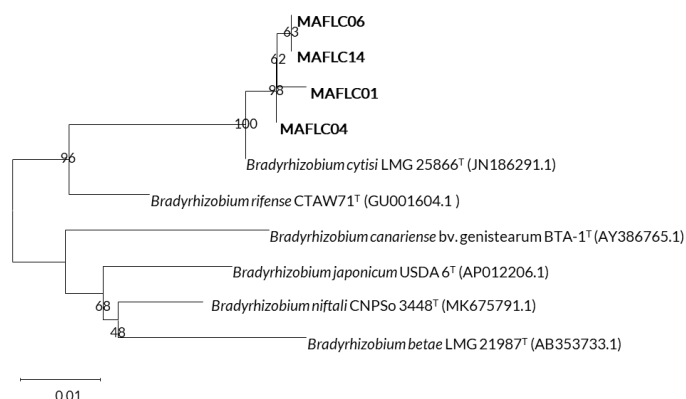


Figura 17. Análisis filogenético del gen *glnII* de algunos aislados de este trabajo pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, junto con las especies más cercanas descritas en el género, realizado mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros

Habitualmente se ha descrito que los endosimbiontes de *Lu. angustifolius* pertenecen al género *Bradyrhizobium*, como se ha observado en las cepas aisladas de nódulos obtenidos en suelo no quemado. Sin embargo, a partir de nódulos de esta planta también hemos aislados otras cepas pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium* y *Rhizobium*, aunque esto no implica que sean endosimbiontes nodulares, sino endófitos,

si no se demuestra su capacidad re infectiva (Peix et al., 2015). Un ejemplo similar son cepas aisladas a partir de *Lo. corniculatus* donde también se han identificado aislados pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, concretamente como *B. cytisi*, siendo los rizobios que nodulan habitualmente a esta especie pertenecientes al género *Mesorhizobium* (Marcos-García et al., 2015). Si bien, durante los últimos años ha cambiado la percepción acerca de la especificidad de *Lotus*, encontrándose que algunas especies pueden ser noduladas por bacterias de diversos géneros como *Rhizobium*, *Neorhizobium* y también del género *Bradyrhizobium* (Lorite et al., 2018).

Por este motivo, se decidió obtener y analizar la secuencia del gen *nodC* de los aislados de este trabajo. Como se ha mencionado anteriormente, el gen *nodC* se utiliza para la determinación de simbiotiros en rizobios, los cuales definen la especificidad de las distintas cepas de microsimbiontes para nodular las distintas especies de leguminosas. En este caso, este gen solo pudo ser amplificado en 11 de los representantes de los grupos de RAPD. Las secuencias obtenidas mostraron que los aislados provenientes de nódulos de *V. villosa* pertenecen a la especie *R. laguerreae* y al simbiovar *viciae* (Figura 18) como otros aislados provenientes de *Lens* y *Pisum* identificados en estudios anteriores en la provincia de Salamanca (Flores-Félix et al., 2019), perteneciendo estas leguminosas al mismo grupo de nodulación cruzada que *Vicia*. Por tanto, muestran una misma afiliación filogenética y un mismo simbiovar (Peix et al., 2015), esto indica que el fondo genético en esta provincia puede estar relacionado con los hallazgos encontrados en este trabajo. Por otra parte, el aislado proveniente de nódulos de *Lu. angustifolius*, MONLA07, identificado como *R. brockwelli*, presentó un gen *nodC* perteneciente al simbiovar *trifolii*, como la cepa tipo a la que pertenecía esta cepa (Young et al., 2023). Sin embargo, al realizar los ensayos de nodulación, como veremos más adelante, esta cepa no produjo nódulos, ya que el simbiovar *trifolii* es muy estricto (Tounsi-Hammami et al., 2019), además *Lupinus* puede ser nodulado por múltiples simbiotiros pero en ningún caso por el simbiovar *trifolii* (Msaddak et al., 2023). También se amplificó el gen *nodC* en los representantes de las cepas MONLC, mostrando en ambos casos una afiliación con el simbiovar *loti* (Figura 18), siendo un resultado esperable como se ha descrito en esta especie y otras cercanas (Lorite et al., 2016). En último lugar, los aislados de nódulos de *Lo. corniculatus* y provenientes de suelos quemados mostraron pertenecer al simbiovar *genistearum* de

acuerdo con la secuencia del gen *nodC* (Figura 18). Hasta el momento sólo se habían descrito algunas cepas cercanas al simbiovar *genistearum* con capacidad para nodular *Lotus* (Lorite et al., 2018).

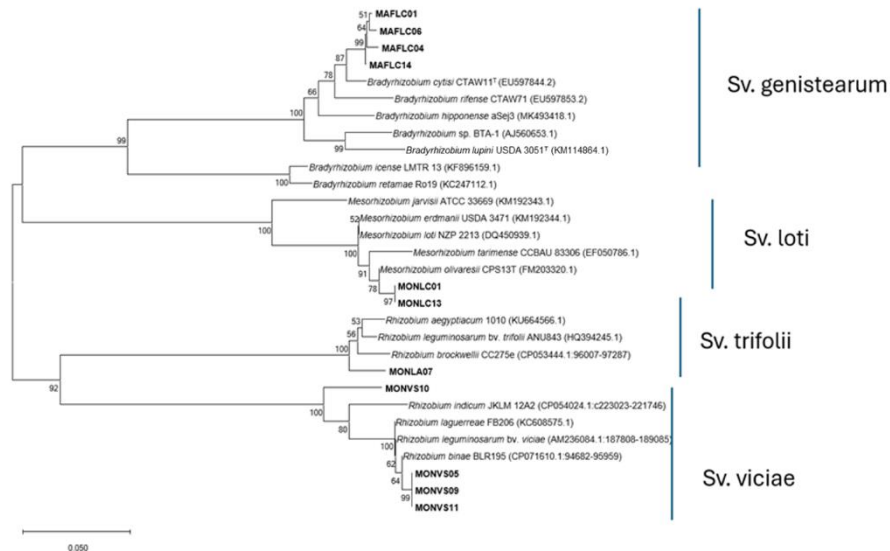


Figura 18. Análisis filogenético del gen *nodC* de algunos aislados de este trabajo pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*, junto con los genes *nodC* de las cepas tipo de las especies más cercanas descritas en el género. Mediante el método Neighbour-Joining y coeficiente de Kimura 2 parámetros.

5.4. Ensayo de nodulación en cámara iluminada

Una vez identificados los representantes de los diferentes grupos de RAPD y su asignación dentro de un simbiovar cuando fue posible, el siguiente paso fue realizar ensayos de nodulación en planta para comprobar la capacidad de reinfección a su planta hospedadora. Con ese fin se hicieron recuentos del número de nódulos y se recogieron además datos de peso fresco y peso seco.

En el caso de *V. villosa* se inocularon las siguientes cepas: MONVS01, MONVS05, MONVS09, MONVS10 y MONVS11. Las cinco cepas mejoraron el desarrollo de la planta comparado con el tratamiento del control negativo (Tabla 16). Además, la cepa MONVS05 incrementó los resultados obtenidos con los controles positivos (Figura 20). También fue esta cepa la que más número de nódulos efectivos causó en las raíces de *V. villosa* como se muestra en la Tabla 16, incrementando significativamente los resultados del control positivo de nodulación. Por estos motivos MONVS05 fue la cepa seleccionada para inocular en el ensayo en invernadero.

Tabla 16. Resultados del ensayo con *V. villosa* en condiciones de cámara iluminada. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA

	C -	C +	C+NOD	MONVS01	MONVS05	MONVS09	MONVS10	MONVS11
Peso fresco (mg)	238 $\pm$ 116 ^a	1.125 $\pm$ 302 ^b	1.312 $\pm$ 179 ^c	228 $\pm$ 115 ^a	1.704 $\pm$ 305 ^d	1.187 $\pm$ 372 ^{bc}	1.141 $\pm$ 94 ^c	1.040 $\pm$ 71 ^c
Peso seco (mg)	41,6 $\pm$ 16 ^a	118 $\pm$ 28 ^b	155 $\pm$ 20 ^b	39 $\pm$ 17 ^a	224 $\pm$ 30 ^c	137 $\pm$ 32 ^c	133 $\pm$ 103 ^b	127 $\pm$ 8 ^b
Nº de nódulos	-	-	26,1 $\pm$ 4,6 ^a	-	35,6 $\pm$ 8,8 ^b	31,1 $\pm$ 8,3 ^{ab}	27,4 $\pm$ 1 ^{ab}	29,1 $\pm$ 2,4 ^{ab}



Figura 19. Plantas de *V. villosa* de los diferentes tratamientos en condiciones de cámara iluminada. A: control negativo. B: control positivo de nodulación. C: control positivo de nitrógeno. D: cepa MONVS01.

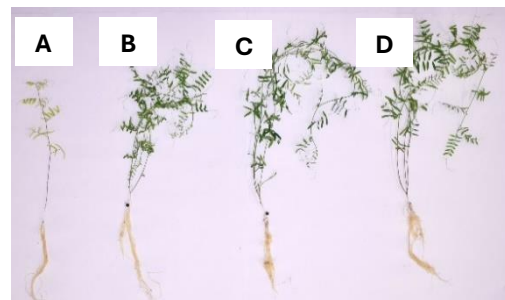


Figura 20. Plantas de *V. villosa* de los diferentes tratamientos en condiciones de cámara iluminada. A: control negativo. B: control positivo de nodulación. C: control positivo de nitrógeno. D: cepa MONVS05

En el caso de *Lu. Angustifolius*, se inocularon las cepas MACLA09, MAFLA02, MAFLA03, MAFLA04, MAFLA07, MONLA04, MONLA07, MONLA09, MONLA14 y MONLA15.

Tabla 17. Resultados del ensayo con *Lu. angustifolius* en condiciones de cámara iluminada. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	C -	C +	NO D +	MA CLA 09	MAF LA02	MAF LA03	MAF LA04	MAF LA07	MON LA04	MON LA07	MON LA09	MON LA14	MON LA15
Peso fresco (mg)	863 $\pm$ 189 ^a	2.902 $\pm$ 303 ^b	1.695 $\pm$ 339 ^b	1.102 $\pm$ 132 ^a	700 $\pm$ 273 ^a	721 $\pm$ 205 ^a	753 $\pm$ 264 ^a	693 $\pm$ 189 ^a	1.749 $\pm$ 325 ^b	831 $\pm$ 231 ^a	821 $\pm$ 164 ^a	671 $\pm$ 120 ^a	791 $\pm$ 275 ^a
Peso seco (mg)	108 $\pm$ 33 ^a	241 $\pm$ 26 ^c	168 $\pm$ 72 ^b	76 $\pm$ 9 ^a	62 $\pm$ 8 ^a	47 $\pm$ 13 ^a	50 $\pm$ 18 ^a	45 $\pm$ 12 ^a	176 $\pm$ 19 ^{bc}	58 $\pm$ 16 ^a	57 $\pm$ 11 ^a	45 $\pm$ 8 ^a	0,072 $\pm$ 0,032 ^a
Nº de nódulos	-	-	14,3 $\pm$ 2,1 ^a	-	-	-	-	-	15,6 $\pm$ 5,1 ^a				-

Como se muestra en la Tabla 17, ninguna de las cepas mejoró de forma significativa el peso fresco del control negativo sin inocular, a diferencia de los controles positivos, con excepción de la cepa MONLA04. La capacidad de esta cepa para promover el crecimiento de la planta es similar a la del control positivo suplementado con nitrógeno y al control positivo de nodulación. Además, como se puede ver en la Figura 21 es la única que fue capaz de nodular, no presentando diferencias significativas respecto al control positivo de nodulación (Tabla 17). Así, esta cepa fue seleccionada para los ensayos de invernadero.



Figura 21. Plantas de *Lu. angustifolius* de los diferentes tratamientos en condiciones de cámara iluminada. A: control negativo. B: control positivo de nitrógeno. C: control positivo de nodulación. D: cepa MONLA04



Figura 22. Plantas de *Lu. angustifolius* de los diferentes tratamientos en condiciones de cámara iluminada. A: control negativo. B: control positivo de nitrógeno. C: control positivo de nodulación. D: cepa MONLA15.

Por último, en *Lo. corniculatus* se inocularon las cepas MONLC01, MONLC13, MAFLC01, MAFLC04, MAFLC06 y MAFLC14.



Figura 23. Plantas de *Lo. corniculatus* de los diferentes tratamientos en condiciones de cámara iluminada. A: control negativo. B: control positivo de nodulación. C: control positivo de nitrógeno. D: cepa MAFLC06.



Figura 24. Plantas de *Lo. corniculatus* de los diferentes tratamientos en condiciones de cámara iluminada. A: control negativo. B: control positivo de nodulación. C: control positivo de nitrógeno. D: cepa MONLC01.

Tabla 18. Resultados del ensayo con *Lo. corniculatus* en condiciones de cámara iluminada. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	C -	C +	NOD +	MON LC01	MON LC13	MAF LC01	MAF LC04	MAF LC06	MAF LC14
Peso fresco (mg)	25 $\pm$ 8 ^a	132 $\pm$ 53 ^b	44 $\pm$ 12 ^a	60 $\pm$ 24 ^b	44 $\pm$ 21 ^a	41 $\pm$ 16 ^a	25 $\pm$ 9 ^a	37 $\pm$ 15 ^a	21 $\pm$ 9 ^a
Peso seco (mg)	3 $\pm$ 1 ^a	22 $\pm$ 6 ^b	5 $\pm$ 1 ^a	7 $\pm$ 2 ^a	6 $\pm$ 2 ^a	5 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 1 ^a	4 $\pm$ 1 ^a	3 $\pm$ 2 ^a
Nº de nódulos	-	-	4,9 $\pm$ 1,6 ^a	4,7 $\pm$ 1,9 ^a	5,8 $\pm$ 2,9 ^b	6,6 $\pm$ 2,5 ^b	4,1 $\pm$ 2,5 ^a	5,8 $\pm$ 1,8 ^a	6,6 $\pm$ 3,5 ^b

La cepa MONLC01 generó los mejores resultados de peso fresco (Tabla 18), siendo la única cepa en mejorar de forma significativa los resultados obtenidos con el control negativo. En el caso del peso seco, tanto la cepa MONLC01 como las cepas MONLC13 y MAFLC01 lograron igualar los resultados obtenidos con la inoculación de la cepa tipo de *M. loti*.

Además, cabe destacar que todas las cepas inoculadas fueron capaces de nodular, independientemente de su identificación como *Mesorhizobium* o *Bradyrhizobium* (Figuras 23 y 24). Estos resultados son inéditos, pues es la primera vez que se describe la capacidad del simbiovar genistearum para nodular esta leguminosa, a pesar de que el género *Lotus* ya ha sido descrito que puede ser nodulado por *Bradyrhizobium* (Zarrabian et al., 2022), nunca por el simbiovar genistearum. De esta manera, se seleccionaron para llevar al ensayo en invernadero las cepas MONLC01 por su gran capacidad para promover el crecimiento en *Lotus*, y la cepa MAFLC01, por haber conseguido igualar al control positivo de nodulación en la cantidad de biomasa generada y provenir de suelos quemados. Estos resultados aumentan el conocimiento sobre los endosimbiontes nodulares asociados a *Lo. corniculatus*, completando así los datos que se han obtenido en los últimos años donde se han encontrado numerosas especies de los géneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, y *Aminobacter* y 2 simbiovares diferentes (sv. *loti* y sv. *lancerottense*) asociados a distintas especies del género *Lotus* (Lorite et al., 2018; Rejili et al., 2020).

5.5. Ensayo de nodulación en invernadero

Con el objetivo de evaluar el potencial de las cepas de este estudio para promover el desarrollo de sus leguminosas en suelos quemados, lo cual podría relacionarse con el potencial del uso de estas plantas junto con sus microsimbiontes para la recuperación

de este tipo suelos, en este ensayo se inocularon las cepas seleccionadas en el apartado 4.4 Se midieron los mismos parámetros que en el ensayo anterior: el peso fresco, el peso seco y el número de nódulos, además de la cantidad de nitrógeno para las especies *V. villosa* y *Lu. angustifolius*. Con este análisis se pretende comprobar si la simbiosis efectiva presenta un aumento de la cantidad de nitrógeno en las plantas.

En el caso de *V. villosa* se inoculó la cepa MONVS05 en plántulas creciendo en suelo quemado. La cepa MONVS05 mostró diferencias significativas en el peso fresco y en el número de nódulos con la cepa *R. laguerreae* FB206^T sv. viciae utilizada en el control positivo de nodulación (Tabla 19). Sin embargo, en el peso seco no tuvo diferencias respecto al control positivo de nodulación. Para todos los valores, esta cepa mostró resultados significativamente mejores que el control negativo. A pesar de ser una cepa aislada del suelo control, mantuvo una alta eficacia de nodulación en el suelo quemado, aunque este suelo tenga alteradas las características debido al paso del incendio.

Tabla 19. Resultados del ensayo con *V. villosa* en condiciones de invernadero. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	C -	C +	MONVS05
Peso fresco (mg)	689 $\pm$ 392 ^a	1.405 $\pm$ 626 ^b	1.744 $\pm$ 786 ^c
Peso seco (mg)	173 $\pm$ 94 ^a	268 $\pm$ 109 ^b	282 $\pm$ 137 ^b
Nº nódulos	0,7 $\pm$ 1.3 ^a	7.2 $\pm$ 4.3 ^b	9.7 $\pm$ 3.9 ^c



Figura 25. Plantas de *V. villosa* de los diferentes tratamientos en condiciones de invernadero. A: control positivo de nodulación. B: control negativo. C: cepa MONVS05.

Cabe destacar también que esta vez se obtuvieron nódulos en el control negativo en el suelo quemado a pesar de que en el ensayo realizado con suelo quemado en la cámara iluminada no se habían obtenido nódulos. Esto puede ser debido a la diferencia temporal con la que se han sacado las dos muestras de suelo para realizar los diferentes ensayos, en torno a unos 8 meses. En este intervalo es posible que se haya regenerado parte de la población microbiana, apareciendo microorganismos capaces de nodular la planta. Otro motivo sería también la incorporación de nuevos microorganismos al suelo debido al viento o las lluvias, que pudieron ser transportados hasta la zona de toma de muestra. Además, como se observa en la Tabla 19, el número de nódulos del control es muy pequeño.

Los resultados del análisis del contenido en nitrógeno se muestran en la Tabla 20. Como podemos observar, las diferencias en los niveles de nitrógeno medidos en el control positivo de nodulación y la cepa MONVS05 no son estadísticamente significativas, y ambos tratamientos mejoran significativamente al control sin inocular. Así, según los datos de producción, nodulación y contenido en nitrógeno, esta cepa presenta una eficiencia similar a la de la cepa tipo de la especie *R. laguerreae*, y su aplicación genera resultados positivos y diferencias estadísticamente significativas con respecto del control negativo sin inocular, lo que demuestra que la aplicación de la bacteria podría mejorar el desarrollo de la leguminosa en suelos quemados.

Tabla 20. Resultados del % de N por materia orgánica seca en *V. villosa* en condiciones de invernadero. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	Control -	Control + NOD	MONVS05
% de N	2,35 $\pm$ 0,06 ^a	3,30 $\pm$ 0,05 ^b	3,24 $\pm$ 0,05 ^b

En el caso de *Lu. angustifolius* se inocularon las cepas MONLA04 y MACLA09. La cepa MONLA04 tuvo diferencias significativas en las tres medidas realizadas. Mostró un aumento en la biomasa de *Lu. angustifolius* como se observa en la Tabla 21 y Figura 25. Además, fue la que más nódulos mostró en comparación con los otros tres tratamientos (Tabla 21). La cepa MONLA04 se identificó como *Bradyrhizobium lupini*, esta se trata de una especie identificada a partir de su aislamiento de nódulos de *Lupinus* spp. Aunque las especies del género *Lupinus* pueden ser noduladas por especies pertenecientes a otros géneros como *Microvirga*, en condiciones de suelos

ácidos las especies más habituales pertenecen al género *Bradyrhizobium*, al igual que en suelos alcalinos. Por lo tanto, *Bradyrhizobium* es el género más comúnmente identificado a través de los aislados de *Lupinus* spp. (Missbah El Idrissi et al., 2021; Sánchez-Cañizares et al., 2011). Aunque también se encuentran en una gran proporción endosimbiontes pertenecientes al género *Phyllobacterium*, concordando estas especies con las cepas identificadas en este trabajo (Valverde et al., 2005). Por lo que parece no haber una adaptación importante de los endosimbiontes nodulares de *Lu. angustifolius* en este tipo de suelos.

Tabla 21. Resultados del ensayo con *Lu. angustifolius* en condiciones de invernadero. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	C -	C + nod	MONLA04	MACLA09
Peso fresco (mg)	3.207 $\pm$ 459 ^a	3.603 $\pm$ 628 ^a	3.825 $\pm$ 521 ^b	3.732 $\pm$ 559 ^a
Peso seco (mg)	435 $\pm$ 104 ^a	469 $\pm$ 106 ^a	547 $\pm$ 103 ^b	540 $\pm$ 74 ^b
Nº nódulos	19,3 $\pm$ 9,9 ^a	20,6 $\pm$ 6,8 ^a	27,5 $\pm$ 8,7 ^b	23,1 $\pm$ 7,2 ^a

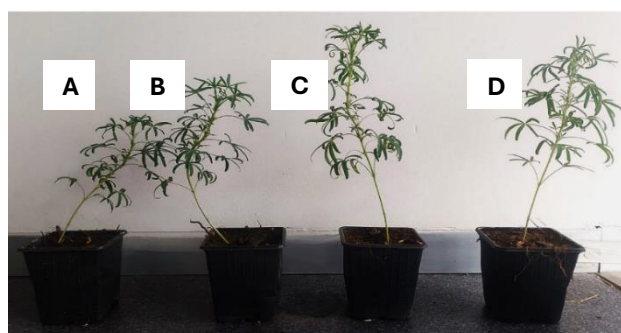


Figura 25. Plantas de *Lu. angustifolius* de los diferentes tratamientos en condiciones de invernadero. A: control negativo. B: control positivo de nodulación. C: cepa MONLA04. D: cepa MACLA09

El análisis del contenido en nitrógeno de la parte aérea de las plantas de *Lu. angustifolius* obtenidas en el ensayo de invernadero mostraron que el tratamiento con la cepa MONLA04 generó un mayor contenido de nitrógeno a *Lu. angustifolius* y presenta diferencias significativas respecto al control positivo de nodulación (Tabla 22). Sin embargo, esta mayor cantidad de nitrógeno no es significativamente distinta de la cepa MACLA09 y el control negativo, aunque es el tratamiento en el que mayor cantidad de nitrógeno presentaron las plantas analizadas (Tabla 22). Además, estos datos unidos a los de producción indican que la inoculación con MONLA04 genera un

incremento en la cantidad total por planta de nitrógeno confirmando su potencial para ser utilizada como bioinoculante de *Lu. angustifolius* en suelos quemados.

Tabla 22. Resultados de la cantidad de N en *Lu. angustifolius* en condiciones de invernadero. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	Control -	Control + NOD	MONLA04	MACLA09
% de N	4,08 $\pm$ 0,212 ^{ab}	3,925 $\pm$ 0,09 ^a	4,48 $\pm$ 0,144 ^b	4,27 $\pm$ 0,114 ^{ab}

En el caso de *Lo. corniculatus*, se inocularon las cepas MONLC01 y MAFLC01 (Figura 44). La cepa que mejores resultados muestra es la MAFLC01 (Tabla 23), al contrario de lo sucedido en la cámara iluminada. La cepa MAFLC01 muestra diferencias significativas respecto el control negativo y la cepa MONLC01. Sin embargo, no presenta diferencias significativas con el control positivo de nodulación, aunque las plantas han desarrollado mayor biomasa y mayor número de nódulos (Tabla 23). Esto indica que la cepa MAFLC01 puede desarrollarse y producir nódulos en suelos quemados a diferencia de la cepa MONLC01. Puede ser que las condiciones de los suelos quemados no permitan un desarrollo óptimo para la cepa MONLC01 y por eso no sea efectiva en estos suelos debido a las características que presentan.

Tabla 23. Resultados del ensayo con *Lo. corniculatus* en condiciones de invernadero. Datos expresados en media $\pm$ D.S. Diferentes letras indican diferencias significativas en un ANOVA seguido de una prueba de Tukey con un $p=0,05$

	C -	C + NOD	MONLC01	MAFLC01
Peso fresco (mg)	171 $\pm$ 80 ^a	284 $\pm$ 60 ^b	129 $\pm$ 63 ^a	341 $\pm$ 140 ^b
Peso seco (mg)	19 $\pm$ 11 ^a	35 $\pm$ 8 ^b	18 $\pm$ 8 ^a	40 $\pm$ 16 ^b
Nº de nódulos	-	3,3 $\pm$ 2,1 ^a	-	4,1 $\pm$ 2,4 ^a



Figura 26. Plantas de *Lo. corniculatus* de los diferentes tratamientos en condiciones de invernadero. A: control negativo. B: control positivo de nodulación. C: cepa MONLC01. D: cepa MAFLC01

La cepa MAFLC01 se trata de un *Bradyrhizobium cytisi*, esto es muy llamativo debido a que las bacterias que establecen simbiosis nodular con *Lo. corniculatus* pertenecen generalmente al género *Mesorhizobium*, como sería el caso de MONLC01 (aislada a partir de plantas trampa en suelo no quemado) (Marcos-García et al., 2017). Esta cepa junto con MAFLC04, MAFLC06 y MAFLC14 pertenecientes al género *Bradyrhizobium* fueron capaces de nodular a *Lo. corniculatus* en condiciones de cámara iluminada y este ensayo ha demostrado que su aplicación puede ser una estrategia acertada para inocular esta leguminosa en suelos quemados tras un incendio. En consecuencia, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de nuevos estudios para conocer en profundidad las interacciones entre *Lotus* y los microsimbiontes en diversas condiciones ambientales, así como los diferentes hallazgos relacionados con la diversidad de los mismos (Lorite et al., 2018; Rejili et al., 2020).

6. Conclusiones

Este trabajo confirmó el potencial de los endosimbiontes nodulares de leguminosas autóctonas para la revegetación y la mejora de la fertilidad de los suelos quemados, siendo efectivos como inoculantes en programas de recuperación de suelos quemados tras un incendio.

- Los fuegos son un factor ambiental que afecta a las poblaciones de endosimbiontes de las leguminosas, limitando los procesos de nodulación naturales.
- Los nódulos de leguminosas son un entorno diverso, pudiendo encontrar una alta diversidad de rizobios en los nódulos de las especies estudiadas.
- Los ensayos de nodulación han mostrado que no todos los aislados nodulares tienen capacidad de formar nódulos.
- *Lotus corniculatus* es una leguminosa promiscua que ha mostrado ser capaz de nodular con las poblaciones de rizobios autóctonas de los suelos empleados en este estudio.
- Por primera vez se describe *Bradyrhizobium cytisi* simbiovar *genistearum* nodulando *Lo. corniculatus*, lo que demuestra que la diversidad de endosimbiontes de leguminosas silvestres está infra estudiada.

- La inoculación de algunas leguminosas como *V. villosa* con rizobios autóctonos puede ser una estrategia adecuada ante la ausencia de endosimbiontes en los suelos.
- *Lo. corniculatus* presenta una gran capacidad de adaptación a suelos quemados, lo que hace de él una buena especie candidata para revegetar este tipo de suelos.

7. Referencias bibliográficas

- Alcañiz, M., Outeiro, L., Francos, M., Farguell, J., & Úbeda, X. (2016). Long-term dynamics of soil chemical properties after a prescribed fire in a Mediterranean forest (Montgrí Massif, Catalonia, Spain). *The Science of the Total Environment*, 572, 1329-1335. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.115>
- Alcañiz, M., Outeiro, L., Francos, M., & Úbeda, X. (2018). Effects of prescribed fires on soil properties: A review. *The Science of the Total Environment*, 613-614, 944-957. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.144>
- Arneth, A., Olsson, L., Cowie, A., Erb, K.-H., Hurlbert, M., Kurz, W. A., Mirzabaev, A., & Rounsevell, M. D. A. (2021). Restoring degraded lands. *Annual Review of Environment and Resources*, 46(1), 569-599. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012320-054809>
- Arunrat, N., Sereenonchai, S., Kongsurakan, P., Iwai, C. B., Yuttitham, M., & Hatano, R. (2023). Post-fire recovery of soil organic carbon, soil total nitrogen, soil nutrients, and soil erodibility in rotational shifting cultivation in Northern Thailand. *Frontiers in Environmental Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1117427>
- Bárcenas-Moreno, G., García-Orenes, F., Mataix-Solera, J., & Mataix-Beneyto, J. (2016). Plant community influence on soil microbial response after a wildfire in Sierra Nevada National Park (Spain). *Science of The Total Environment*, 573, 1265-1274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.013>
- Bekdouche, F., Sahnoune, M., Krouchi, F., Achour, S., Guemati, N., & Derridj, A. (2011). The contribution of legumes to post-fire regeneration of *Quercus suber* and *Pinus halepensis* forests in Northeastern Algeria. *Revue d'Écologie*, 66(1), 29-42.
- Chávez Díaz, L., González, P., Rubio, E., & Melchiorre, M. (2013). Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1153-1165. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0814-6>
- Díaz-Raviña, M., Prieto, A., & Bååth, E. (1996). Bacterial activity in a forest soil after soil heating and organic amendments measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(3), 419-426. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00156-5)
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., Chu, X., & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 41-51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Fernández, C., & Vega, J. A. (2016). Effects of mulching and post-fire salvage logging on soil erosion and vegetative regrowth in NW Spain. *Forest Ecology and Management*, 375, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.05.024>

- Fernández-García, V., Marcos, E., Huerta, S., & Calvo, L. (2021). Soil-vegetation relationships in Mediterranean forests after fire. *Forest Ecosystems*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40663-021-00295-y>
- Flores-Félix, J. D., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Squartini, A., Rivas, R., & Velázquez, E. (2019). Analysis of the Interaction between *Pisum sativum* L. and *Rhizobium laguerreae* strains nodulating this legume in Northwest Spain. *Plants*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/plants9121755>
- Flores-Félix, J. D., Sánchez-Juanes, F., Araujo, J., Díaz-Alcántara, C. A., Velázquez Pérez, E., & González-Andrés, F. (2023). Two novel symbiovars of *Bradyrhizobium yuanmingense*, *americaense* and *caribense*, the symbiovar *tropici* of *Bradyrhizobium pachyrhizi* and the symbiovar *cajani* of *Bradyrhizobium cajani* are microsymbionts of the legume *Cajanus cajan* in Dominican Republic. *Systematic and applied microbiology*, 46(5), <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2023.126454>
- Franco, M., Vieira, A., Bento-Gonçalves, A., Úbeda, X., Zema, D. A., & Lucas-Borja, M. E. (2023). Effects of wildfire, torrential rainfall and straw mulching on the physicochemical soil properties in a Mediterranean forest. *Ecological Engineering*, 192, 106987. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2023.106987>
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., & 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(Pt 6), 2037-2048. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>
- Gómez-Rey, M. X., Couto-Vázquez, A., García-Marco, S., Vega, J. A., & González-Prieto, S. J. (2013). Reduction of nutrient losses with eroded sediments by post-fire soil stabilisation techniques. *International Journal of Wildland Fire*, 22(5), 696. <https://doi.org/10.1071/WF12079>
- González Sama, A., Coba de la Peña, T., Redondo Vela, F. J., María de las Heras, N. de, Guasch Pereira, L., Fedorova, E., de Lorenzo, C., Hernandez Jimenez, M. J., Pozuelo Guanche, J. M., Golvano Herrero, M. P., Felipe Antón, M. R. de, Pueyo Dabad, J. J., Fernández Pascual, M., & Lucas Sánchez, M. M. (2006). Características especiales de la simbiosis «*Lupinus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)». *Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, 2006, ISBN 84-611-1198-2, 182-193*, 182-193. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6516280>
- Goyal, R. K., Mattoo, A. K., & Schmidt, M. A. (2021). Rhizobial–host interactions and symbiotic nitrogen fixation in legume crops toward agriculture sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669404>
- Hu, M., Wang, J., Lu, L., Gui, H., & Wan, S. (2023). Global recovery patterns of soil microbes after fire. *Soil Biology and Biochemistry*, 183, 109057. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.109057>
- Jiao, J., Ni, M., Zhang, B., Zhang, Z., Young, J. P. W., Chan, T.-F., Chen, W. X., Lam, H.-M., & Tian, C. F. (2018). Coordinated regulation of core and accessory genes in the multipartite genome of *Sinorhizobium fredii*. *PLoS Genetics*, 14(5), e1007428. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007428>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W5-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Kramina, T., Samigullin, T., & Meschersky, I. (2020). Two cryptic species of *Lotus* (Fabaceae) from the Iberian Peninsula. *Wulfenia*, 27, 21-45.

- Kuzmanović, N., Fagorzi, C., Mengoni, A., Lassalle, F., & diCenzo, G. C. (2022). Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: Proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(3), 005243. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005243>
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 4), 981-993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>
- Li, Z., Wei, J., He, W., Cao, X., Zhou, X., & Tian, Q. (2024). Effect of plant-soil system on the restoration of community stability after wildfire in the northeast margin of Qinghai-Tibet plateau. *Scientific Reports*, 14(1), 10706. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61621-2>
- Lorenzo, D., Tovar, F., & Martín Peinado, F. (2021). Evaluation of soil evolution after a fire in the Southeast of Spain: a multiproxy approach. *Spanish Journal of Soil Science*, 11, 10010. <https://doi.org/10.3389/sjss.2021.10010>
- Lorite, M. J., Flores-Félix, J. D., Peix, Á., Sanjuán, J., & Velázquez, E. (2016). *Mesorhizobium olivaresii* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(8), 557-561. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.09.003>
- Lorite, M. J., Estrella, M. J., Escaray, F. J., Sannazzaro, A., Videira e Castro, I. M., Monza, J., & León-Barrios, M. (2018). The Rhizobia-*Lotus* symbioses: deeply specific and widely diverse. *Frontiers in microbiology*, 9, 408336
- Marcos García, M. (2017). Estudio de la biodiversidad bacteriana asociada a nódulos de *Lotus corniculatus* y análisis de los procesos de infección, nodulación y producción vegetal inducidos por cepas del género *Mesorhizobium*. *Posgrado. Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca* <https://doi.org/10.14201/gredos.137084>
- Marcos-García, M., Menéndez, E., Cruz-González, X., Velázquez, E., Mateos, P. F., & Rivas, R. (2015). Erratum to: The high diversity of *Lotus corniculatus* endosymbionts in soils of northwest Spain. *Symbiosis*, 67(1), 21-24. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0381-3>
- Marcos-García, M., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., Mateos, P. F., Peix, Á., Velázquez, E., & Rivas, R. (2017). *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov., isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2301-2305. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001942>
- Mastrolonardo, G., Castelli, G., Certini, G., Maxwald, M., Trucchi, P., Foderi, C., Errico, A., Marra, E., & Preti, F. (2024). Post-fire erosion and sediment yield in a Mediterranean forest catchment in Italy. *International Journal of Sediment Research*, 39(3), 464-477. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2024.03.008>
- Mataix-Solera, J., & Guerrero, C. (2007). Efectos de los incendios forestales en las propiedades edáficas. *Incendios Forestales, Suelos y Erosión Hídrica* (pp. 5-40).
- Mataix-Solera, J., Guerrero, C., García-Orenes, F., Bárcenas, G. M., & Torres, M. P. (2009). Forest fire effects on soil microbiology. *Fire Effects on Soils and Restoration Strategies*. CRC Press.
- Meena, R. S., & Lal, R. (2018). Legumes and sustainable use of soils. *Legumes for Soil Health and Sustainable Management* (pp. 1-31). https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4_1
- Missbah El Idrissi, M., Bouhnik, O., ElFaik, S., Alami, S., Lamin, H., Bedmar, E. J., & Abdelmoumen, H. (2021). Characterization of *Bradyrhizobium* spp. nodulating *Lupinus cosentinii* and *L. luteus* microsymbionts in Morocco. *Frontiers in Agronomy*, 3. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.661295>

- Morán-Ordóñez, A., Duane, A., Gil-Tena, A., De Cáceres, M., Aquilué, N., Guerra, C. A., Geijzendorffer, I. R., Fortin, M.-J., & Brotons, L. (2020). Future impact of climate extremes in the Mediterranean: Soil erosion projections when fire and extreme rainfall meet. *Land Degradation & Development*, 31(18), 3040-3054. <https://doi.org/10.1002/ldr.3694>
- Msaddak, A., Mars, M., Quiñones, M. A., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2023). Lupin, a unique legume that is nodulated by multiple microsymbionts: the role of horizontal gene transfer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6496. <https://doi.org/10.3390/ijms24076496>
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17-42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- Prosdocimi, M., Tarolli, P., & Cerdà, A. (2016). Mulching practices for reducing soil water erosion: A review. *Earth-Science Reviews*, 161, 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.08.006>
- Rejili, M., BenAbderrahim, M. A., Mars, M., & Sherrier, J. D. (2020). Novel putative rhizobial species with different symbiovars nodulate *Lotus creticus* and their differential preference to distinctive soil properties. *FEMS Microbiology Letters*, 367(11).
- Rejili, M., Off, K., Brachmann, A., & Marín, M. (2020). *Bradyrhizobium hipponense* sp. nov., isolated from *Lupinus angustifolius* growing in the northern region of Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(10), 5539-5550. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004445>
- Renzi, J. P., Chantre, G. R., Smýkal, P., Presotto, A. D., Zubiaga, L., Garayalde, A. F., & Cantamutto, M. A. (2020). Diversity of naturalized hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) populations in central Argentina as a source of potential adaptive traits for breeding. *Frontiers in Plant Science*, 11, 189. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00189>
- Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P. F., 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(4), 412-418. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02086.x>
- Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., & Martinez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>
- Salgado, L., Alvarez, M. G., Díaz, A. M., Gallego, J. R., & Forján, R. (2024). Impact of wildfire recurrence on soil properties and organic carbon fractions. *Journal of Environmental Management*, 354, 120293. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120293>
- Sánchez-Cañizares, C., Rey, L., Duran, D., Temprano, F., Sánchez-Jiménez, P., Navarro, A., ... & Ruiz-Argüeso, T. (2011). Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and applied microbiology*, 34(3), 207-215.
- Schönián, G., Meusel, O., Tietz, H. J., Meyer, W., Gräser, Y., Tausch, I., Presber, W., & Mitchell, T. G. (1993). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses*, 36(5-6), 171-179. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1993.tb00746.x>

- Stępkowski, T., Moulin, L., Krzyńska, A., McInnes, A., Law, I. J., & Howieson, J. (2005). European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting *Lupinus* and *Serradella* in soils of western Australia and South Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7041-7052. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7041-7052.2005>
- Sweet, R., Sweet, R., & Smith, E. D. (1823). The British flower garden: Containing coloured figures & descriptions of the most ornamental & curious hardy herbaceous plants. Published for the author by W. Simpkin and R. Marshall. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.129229>
- Terribile, F., Renella, G., Ajmone Marsan, F., Ciampalini, R., Comolli, R., Ferraris, S., Freppaz, M., Gardi, C., Mileti, F. A., Padoan, E., Said-Pullicino, D., Sellami, M. H., Spaccini, R., Stanchi, S., & Zucca, C. (2024). The future of soil Science in Italy. *Soil Science in Italy: 1861 to 2024* (pp. 135-181). https://doi.org/10.1007/978-3-031-52744-9_7
- Terribile, F., Spaccini, R., Renella, G., Ajmone Marsan, F., Freppaz, M., Padoan, E., Said-Pullicino, D., Stanchi, S., Ciampalini, R., Comolli, R., Ferraris, S., Gardi, C., Mileti, F., Sellami, M. H., & Zucca, C. (2024). *The Future of Soil Science in Italy* (pp. 135-181). https://doi.org/10.1007/978-3-031-52744-9_7
- Thomé, O. W. (1885). *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Zezschwitz. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.11981>
- Tounsi-Hammami, S., Le Roux, C., Dhane-Fitouri, S., De Lajudie, P., Duponnois, R., & Ben Jeddi, F. (2019). Genetic diversity of *rhizobia* associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(4), 448-456. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.04.002>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Valverde, A., Velazquez, E., Fernandez-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P. F., ... & Willems, A. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1985-1989.
- Velázquez, E., Valverde, A., Rivas, R., Gomis, V., Peix, Á., Gantois, I., Igual, J. M., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2010). Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97(4), 363-376. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9415-7>
- Villadas, P. J., Lasa, A. V., Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., & Fernández-López, M. (2017). Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.11.008>
- 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 (*Papilionoideae: Genisteae*) 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(2), 569-575. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63292-0>

- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334-342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
- Yang, C., Sun, R., Lu, X., Jin, T., Peng, X., Zhang, N., Wang, J., Wang, H., & Liu, W. (2022). Seed-Germination ecology of *Vicia villosa* Roth, a cover crop in orchards. *Agronomy*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102488>
- Young, J. P. W., Jorriin, B., Moeskjær, S., & James, E. K. (2023). *Rhizobium brockwellii* sp. nov., *Rhizobium johnstonii* sp. nov. and *Rhizobium beringeri* sp. nov., three genospecies within the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(7), 005979. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005979>
- Yuvaraj, M., Pandiyan, M., Gayathri, P., Yuvaraj, M., Pandiyan, M., & Gayathri, P. (2020). Role of legumes in improving soil fertility status. *Legume Crops—Prospects, Production and Uses*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93247>