

# Diversidad de especies del género *Lupinus* L. y de sus simbiosis en el departamento de Ancash

## Species diversity of genus *Lupinus* L. and their symbionts at Ancash department

Pedro Lezama A.<sup>1</sup>, Karina Lezama A.<sup>2</sup>, José Gómez, C., Tomasz Stepkowski<sup>3</sup>

### Resumen

El género *Lupinus* L. (Fabaceae) presenta un elevado número de especies y ha ocasionado muchas controversias en su taxonomía, razones que han motivado realizar el estudio de las especies de este género y sus simbiosis en el departamento de Ancash, basado en que no se encontró antecedentes de estudios semejantes en esta zona. Se colectaron muestras botánicas y nódulos bacterianos, realizando un análisis in situ, y en laboratorio, utilizando descriptores estandarizados. Con estos datos se confeccionaron matrices para las especies identificadas del género *Lupinus*: *L. subtomentosus* C.P. Sm, *L. mutabilis* Sweet., *L. brachypremnon* C.P Sm, *L. carazensis* Ulbr., *L. lindleyanus* J. Agardh, *L. aff mutabilis*, *L. eriocladius* Ulbr., *L. aridulus* C.P. Sm, *L. weberbaueri* Ulbr., *L. paniculatus* Desr, y sus correspondientes bacterias simbióticas; siete de las cuales pertenecen al género *Bradyrhizobium* y tres a *Mesorhizobium*, obteniéndose fenogramas independientes, para luego generar un árbol de consenso, usando para cada caso el algoritmo UPGMA con el software NTSys 2.2, con cuyo análisis se llega a la conclusión de que las características de los nódulos bacterianos y sus simbiosis podrían ser usados para mejorar los estudios taxonómicos del género *Lupinus*, al menos bajo las condiciones de estudio. Así mismo, se amplía el área de distribución de *L. aridulus* para en el departamento de Ancash.

**Palabras clave:** *Bradyrhizobium*, *Lupinus*, *Mesorhizobium*, nódulos bacterianos, simbiosis, UPGMA.

### Abstract

While many botanical groups have received study, some plant genera lack complete information on their number of species. Such is the case with the genus *Lupinus* L. (Fabaceae), which has many described species and their taxonomy remains controversial. With this a background, we have investigated studies into the diversity of *Lupinus* species and their symbiotic bacteria in the Department of Ancash on the western slope of the Andes in Northern Peru. Both botanical and bacterial nodules samples were collected, including an in situ analysis, and subsequently in the laboratory using standardized descriptors. Using these data, a matrix was constructed for species of *Lupinus*: *L. subtomentosus* C.P. Sm, *L. mutabilis* Sweet., *L. brachypremnon* C.P Sm, *L. carazensis* Ulbr., *L. lindleyanus* J. Agardh, *L. aff mutabilis*, *L. eriocladius* Ulbr., *L. aridulus* C.P. Sm, *L. weberbaueri* Ulbr., *L. paniculatus* Desr, and their nodules and bacteria, usually *Bradyrhizobium* but three species with *Mesorhizobium* also. Phenograms for each were generated and a consensus tree constructed using the algorithm UPGMA of NTSys 2.2 software. Our analysis suggest that nodules and their characteristic bacteria may be useful as additional taxonomic markers, at least under these specific study conditions. Besides, the distribution area for *L. aridulus* is extended to Ancash.

**Key words:** *Bradyrhizobium*, *Lupinus*, *Mesorhizobium*, bacterial nodules, symbiosis, UPGMA.

1. Universidad Privada Antenor Orrego.  
2. Polish Academy of Sciences, Polonia.  
3. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad tiene diferentes acepciones, sobre todo dado el interés para su conservación, pero existe concordancia en que ésta involucra la variedad y variabilidad entre los organismos vivos y la complejidad ecológica en la que ellos ocurren. De manera clásica, se refiere a la riqueza o número de especies, contextualizado como diversidad alfa; y a nivel molecular la variabilidad genética que se presenta a nivel intraespecífico, constituyendo la fuente primordial para la evolución de las especies, esto es la diversidad genética; y a un nivel superior la biodiversidad se refiere a las variaciones entre los ecosistemas y las interrelaciones que entre ellas existe, denominándose a ella diversidad beta, y desarrollado en la heterogeneidad geográfica, o diversidad gamma (Primack, 2004). Por lo tanto, su desarrollo está influenciado por los procesos naturales que se presentan y por acción del ser humano (Halffter, 2005).

En los vegetales, la división *Magnoliophyta*, o plantas con flores son el grupo más grande de plantas, con aproximadamente 250,000 especies (WCMC, 2007), de ellas *Fabaceae*, es la tercera familia más grande, con ca. 750 géneros y más de 20,000 especies (ILDIS, 2007), de gran importancia económica para actividades de tala, drogas, alimentos, medicamentos, fertilizante, leña, sistemas agroforestales, entre otras (Giller & Vargas, 1996), y se distribuyen de acuerdo a fenómenos geográficos y climáticos, desde el nivel del mar hasta sobre los 4 800 m (Barneby, 1989). Dentro de esta familia, el género *Lupinus* es cosmopolita y se distribuye en una variedad de hábitats, pero concentrándose en el Mediterráneo, África, (hemisferio oriental) y en América (hemisferio occidental); de ellos en esta última región se encuentra el mayor número de especies, y con su máxima diversidad en el Perú, debido entre otros factores a la influencia de la cordillera de los Andes (Kurlovich, 2002). Hasta la fecha, no se conoce exactamente el total de especies que habitan en esta zona, la misma puede deberse a la inaccesibilidad de algunos lugares donde estas plantas crecen, falta de trabajos científicos, amplitud en la variabilidad, estrechez en la variabilidad de caracteres, área demasiado extensa e información inconsistente (Kurlovich, 2002).

Una particularidad de las *Fabaceae* es la simbiosis que establecen con ciertas bacterias fijadoras de nitrógeno, contribuyendo a la productividad del suelo, puesto que el nitrógeno, elemento indispensable para la nutrición vegetal, pese a su abundancia en la atmósfera (78%), se halla en cantidades deficientes en los suelos tropicales y subtropicales (Campillo et al., 2003). A la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por las *Fabaceae* se considera como una gran alternativa para lograr una agricultura sostenible (Campillo et al., 2003), y

el género *Lupinus* es uno de los mejores que participa activamente en el sistema de FBN (Kurlovich et al., 2002), habiéndose comprobado que es nodulado por el género bacteriano *Bradyrhizobium*, y probablemente *Mesorhizobium*, ambos con cepas específicas para las especies o al menos para los grupos, pudiéndose usar como un marcador taxonómico (Weir, 2007).

En el Perú no contamos con trabajos completos sobre la diversidad de *Lupinus*; los datos revisados son controversiales; tampoco se ha investigado la simbiosis rizobio- lupino, por lo que los estudios morfo-taxonómicos de esta asociación podría dilucidar, al menos en parte, la diversidad de este género (Kurlovich et al., 2002), toda vez que el análisis de los caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de las cepas microbianas que nodulan a un género o especie dan los pasos iniciales para un mejor conocimiento taxonómico, y su posterior estudio y confirmación molecular, permite efectuar estudios filogenéticos y biogeográficos, dando lugar a la taxonomía polifásica (Weir, 2007). Por lo anterior, se tuvo como objetivo estudiar la diversidad de este género y sus simbioses en el departamento de Ancash, y con ello contribuir al esclarecimiento taxonómico de la especie en nuestro país.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron estudios de campo y de laboratorio; los primeros a través de muestreos periódicos

cada 3 meses a las diversas provincias del departamento de Ancash, para la colección de material botánico y nódulos bacterianos.

### Métodos y técnicas

- Las muestras del género *Lupinus* se colectaron empleando las técnicas estándares, y caracterizadas *in situ* usando los descriptores para este género (Faverova, 2001), para su posterior identificación en el Museo USM y/o enviando las muestras a los especialistas.
- Simultáneamente, de cada uno de los especímenes se colectaron los nódulos bacterianos, se caracterizaron *in situ* y mantenidos en sílica gel se trasladaron al laboratorio. Las muestras botánicas y microbianas se etiquetaron con el mismo número.
- En el laboratorio, los rizobios fueron reactivados, aislados, purificados y mantenidos en el cepario, usando como medio YMA (Vincent, 1975). En ellos se efectuaron las pruebas fisiológicas y bioquímicas, con protocolos ya establecidos; y parte fueron enviadas al Instituto de Química Biorgánica de Polonia, para su caracterización molecular correspondiente

### Construcción del fenograma

- Para establecer las similitudes entre las OTU, se construyeron fenogramas taxonómicos, utilizando el método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).
- Con los datos obtenidos de los análisis botánicos y microbiológicos, in situ y en laboratorio, se construyeron las matrices utilizando el programa Excel, las mismas que fueron transformadas y analizadas por separado siguiendo los pasos del Programa NTsys 2.2, para entorno Windows, para luego determinar el fenograma de consenso respectivo.

### 3. RESULTADOS

Se han identificado en total 10 especies de *Lupinus*, y para cada uno se tipificaron sus rizobios usando sus características culturales, que corresponden a los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, con predominio del primero. (Tabla 1).

Los fenogramas se construyeron usando el método UPGMA. Para *Lupinus* se observan tres grandes agrupaciones o clusters, la primera con un coeficiente general de similitud de 0,59, conformada por *L. subtomentosus*, *L. eriocladus*, *L. paniculatus*, *L. brachypremnon*, *L. mutabilis*, y *L. aff. mutabilis*, pero distribuidos en 4 subgrupos; el segundo grupo integrado por *L. carazensis*, *L. aridulus* y *L. lindleyanus*, con un coeficiente de 0,76 y el último con una sola especie *L. weberbaueri*. (Fig. 1).

Tabla 1. Especies de *Lupinus* y sus rizobios identificadas en el departamento de Ancash

Coordenadas	Especie de <i>Lupinus</i>	Rizobio
08° 44' 42.25" S 77° 10' 03.83 W	<i>Lupinus subtomentosus</i> C.P. Sm	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Lupinus brachypremnon</i> C.P. Sm	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Lupinus carazensis</i> Ulbr.	<i>Mesorhizobium</i>
10° 16' 28-51" S; 76° 58' 26.96" W	<i>Lupinus lindleyanus</i> J. Agardh	<i>Mesorhizobium</i>
	<i>Lupinus aff mutabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Lupinus eriocladus</i> Ulbr	<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Lupinus aridulus</i> C.P. Sm	<i>Mesorhizobium</i>
	<i>Lupinus weberbaueri</i> Ulbr.	<i>Bradyrhizobium</i> .
	<i>Lupinus paniculatus</i> Desr.	<i>Bradyrhizobium</i> .

En caso de los rizobios, se observan básicamente dos grandes clusters; la primera, con una similitud de 0,51 conformada por *L. subtomentosus*, *L. brachypremnon*, *L. eriocladus*, *L. carazensis*, *L. lindleyanus* y *L. aridulus*; y un segundo grupo conformado por *L. mutabilis*, *L. aff. mutabilis*, *L. weberbaueri* y *L. paniculatus* con un coeficiente de similitud de 0,57 (Fig. 2).

En el análisis de consenso estricto se identifican tres cluster principales. (Fig. 3). El primero con un coeficiente de similitud de 0,59, conformada por *L. subtomentosus*, *L. eriocladus*, *L. paniculatus*, *L. brachypremnon*, *L. mutabilis*, y *L. aff. mutabilis*, pero distribuidos en cuatro subgrupos; el segundo con un coeficiente de 0,76 integrado por *L. carazensis*, *L. aridulus* y *L. lindleyanus*, y el tercero con un coeficiente de similitud de 0,53 respecto a los dos clusters anteriores, conformado por una sola especie. *L. weberbaueri*.

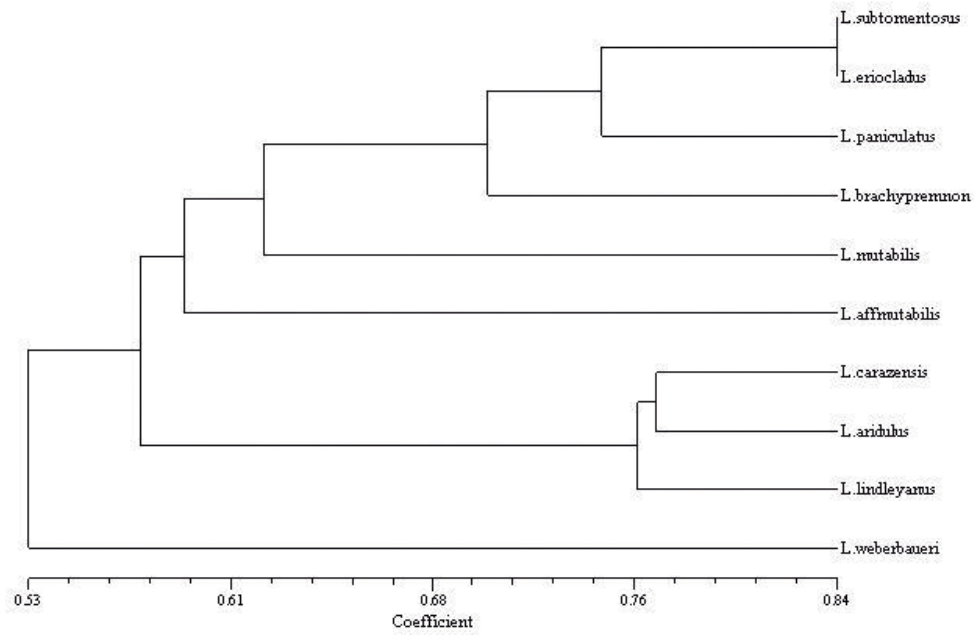


Fig 1. Fenograma para las especies de *Lupinus*, obtenido a partir del análisis de sus descriptores

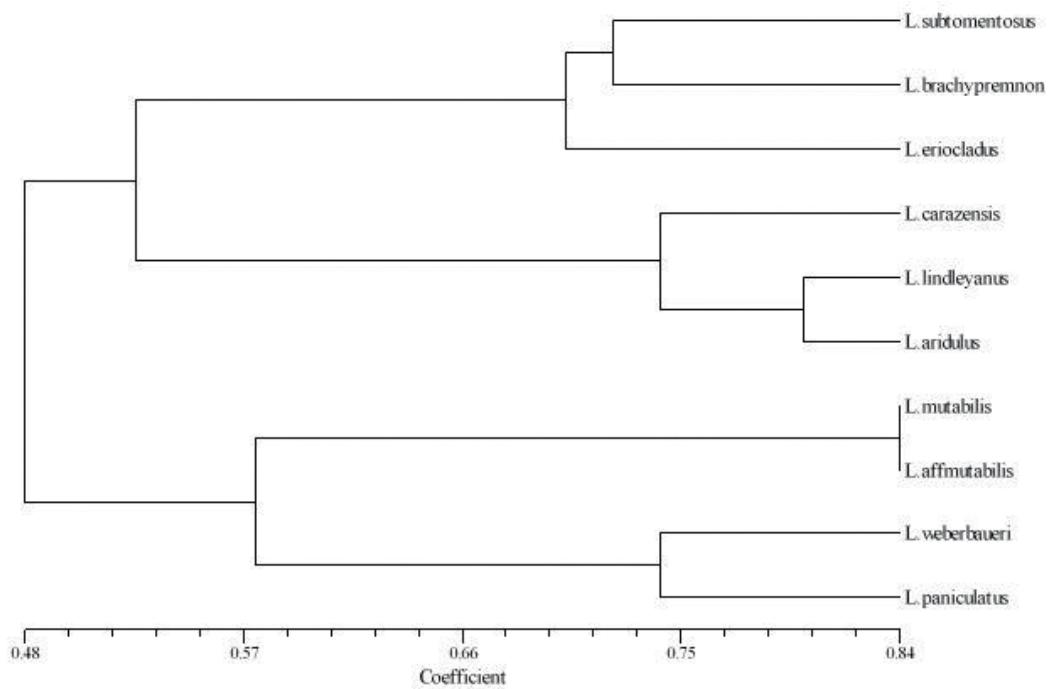


Fig. 2. Fenograma para las especies de *Lupinus*, obtenido del análisis de los descriptores de los rizobios.

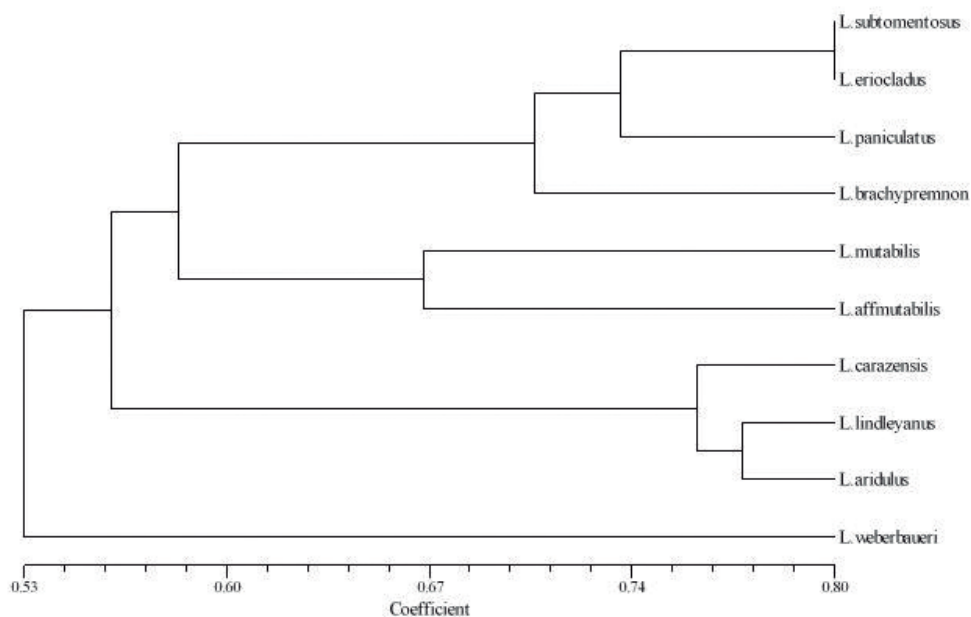


Fig. 3. Árbol de consenso estricto para *Lupinus* – rizobios obtenido a partir del análisis de ambos descriptores.

#### 4. DISCUSIÓN

En el departamento de Ancash se identificaron 10 especies de *Lupinus*, de ellas *L. carazensis*, *L. lindleyanus* y *L. aridulus*, son noduladas por *Mesorhizobium*, y las demás por *Bradyrhizobium*. Para nuestro país no se encontró reportes sobre la interrelación *Lupinus* - rizobios; pero sí para especies europeas (Stepkewski, et. Al., 2007), y en México (Wang et al., 2007) se reportó la nodulación de *Lupinus* por *Bradyrhizobium* o *Mesorhizobium*, y probablemente sería nodulada también por el género *Azorhizobium* (Wojciechowski & Mahn, 2007), que sería producto de una coevolución entre ambas especies, debido a la variabilidad genética intra e interespecífica existente, pero influenciada también por la variabilidad geográfica o las condiciones ecológicas específicas (McPeck, 2007).

La interacción planta-microorganismo se establece por acción de señales moleculares como exopolisacáridos y lipopolisacáridos; que a su vez suprimen los mecanismos de defensa (Morgante et al., 2007), previo logro del quórum sensing o número adecuado para iniciar la invasión y colonización de las raíces (Lerat & Morán, 2004).

Los análisis de localización de nódulos bacterianos, su coloración, forma, tamaño y ornamentación externa son un indicador de su importancia taxonómica, por ejemplo en cuanto a *L. carazensis* y *L. aridulus*, sus nódulos se ubican a un solo lado de la raíz principal, mientras que en *Lupinus subtomentosus*, y *Lupinus brachypremnon*, ocupan uno o dos lugares pero con un conglomerado de nódulos a manera de roseta, de cuya disgregación se

aprecia que los más funcionales se encuentran adheridas a la raíz, y las senescentes hacia la superficie, probablemente porque se protege la actividad de la nitrogenasa, la misma que es sensible al oxígeno (Dixon & Wheeler, 1993). Esto se debería a que durante la colonización radicular por el microorganismo, éstas se distribuyen irregularmente en el rizoplasma en función del tipo de planta y la estructura física, química y biológica de esta zona, y los factores que en ella confluyen, como el tipo de suelo y los minerales que en ella se encuentran, de manera particular el nitrógeno (Milford, 1997).

Los coeficientes de similitud obtenidos y el análisis de los fenogramas construido por el método UPGMA, usando los descriptores de *Lupinus* (fig. 1) y los rizobios (fig. 2), son un reflejo de lo observado en la morfología, y con el árbol de consenso (fig. 3) se observa que los grupos formados son semejantes al obtenido individualmente; tal como la coincidencia entre el grupo formado por *L. subtomentosus* y *L. eriocladus*, aunque con una afinidad menor, en este caso 80% frente al 84% del primero; de igual manera en este subgrupo con una correlación del 74% se encuentra *L. paniculatus* y *L. brachypremnon*. Por ello el análisis UPGMA constituye una herramienta valiosa para estos tipos de estudios, pese a la dificultad para la identificación de las especies de *Lupinus*, aunque ahora con el uso de técnicas y herramientas moleculares como hibridación DNA, RFLP, RAPD-PCR (Wang & Martínez, 2007), secuenciación de genes Nod y housekeeping, gen 16S rRNA y secuencia ITS se hace más rápido aclarar dichas dudas, pese a que aún existen algunas controversias en los resulta-



dos (Stepkowski et al., 2007).

Anteriormente, *L. aridulus* solo estuvo reportado para Puno y Cusco, pero ahora se identificó a esta especie para el departamento de Ancash, específicamente en la provincia de Corongo, probablemente por la similitud geológica entre ambas zonas, puesto que las formaciones de la cadena del Vilcanota (Tupayachi, 2003) y la de las cordilleras Blanca y Negra se habrían originado de manera paralela con el levantamiento de la cordillera de los Andes y su posterior diferenciación, aproximadamente a partir del periodo Cretácico (Cárdenas, 1996).

## 5. CONCLUSIONES

- En el departamento de Ancash se registraron 10 especies del género *Lupinus*: *Lupinus subtomentosus* C.P. Sm, *Lupinus mutabilis* Sweet., *Lupinus brachypremnon* C.P. Sm, *Lupinus carazensis* Ulbr., *Lupinus lindleyanus* J. Agardh, *Lupinus aff mutabilis*, *Lupinus eriocladus* Ulbr, *Lupinus aridulus* C.P. Sm, *Lupinus weberbaueri* Ulbr. y *Lupinus paniculatus* Desr.
- Los rizobios que nodulan a las diversas especies de *Lupinus* en el departamento de Ancash pertenecen al género *Mesorhizobium*, para las especies *Lupinus carazensis* Ulbr., *Lupinus lindleyanus* J. Agardh, y *Lupinus aridulus* C.P. Sm. Y al género *Bradyrhizobium*, para las especies *Lupinus subtomentosus* C.P. Sm, *Lupinus mutabilis* Sweet., *Lupinus aff. mutabilis*, *Lupinus eriocladus* Ulbr., *Lupinus weberbaueri* Ulbr. y *Lupinus paniculatus* Desr.
- El análisis UPGMA de fenogramas nos indica que las características morfológicas de los nódulos y las peculiaridades fisiológicas y bioquímicas de los simbioses ayudan a mejorar los estudios taxonómicos de las especies del género *Lupinus*.
- Se registra para el departamento de Ancash *Lupinus aridulus* C.P. Sm, hasta ahora reportada solamente para los departamentos de Cusco y Puno, con lo cual se amplía su área de distribución en el Perú.

## 6. AGRADECIMIENTOS

A las autoridades de la Universidad Privada Antenor Orrego por el apoyo económico y las facilidades brindadas para el desarrollo de la investigación.

A colegas y amigos con cuyas sugerencias se pudo mejorar el desarrollo de la investigación.

A la universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Instituto de Química Biorgánica, Polish Academy of Sciences, Polonia, por el apoyo brindado para la culminación de la investigación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Barneby, R. C. (1989) *Lupinus* L. En A. Cronquist, A.; Holmgren, H.; Holmgren, N.; Reveal, J.; Holmgren, P.K. (Eds.). *Vascular plants of the intermountain West*, USA. NYBG. Vol. (3B): 237–267.
- Campillo, R.; Urquiaga, S.; Pino, I.; Montenegro, A. (2003). Estimación de la Fijación Biológica de Nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del N. *Agríc. Téc.* INIA, Chile. Vol.63 (2): 169-179.
- Cárdenas, D. (1996). Corongo y sus recursos. Edit. Moises Chávez. 283 pp .Lima.
- Faverova, H. (2001). . Descriptor List of Genus *Lupinus*. L. Agritec. Praga: 20 pp.
- Halffter, G., (2005). Towards a culture of biodiversity conservation. *Acta Zoológica Mexicana*. 21(2):133-153.
- ILDIS. (2007). Catalogue of life: 2007 Annual Checklist. Disponible en URL: <http://www.ildis.org/leguminosae>.
- Kurlovich, B. (2002). The history of Lupin domestication. En Kurlovich, B. *Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding*. St. Petersburg Pub. House; 147-164.
- Kurlovich, B.; Tikhonovich, I, Kartuzova, L.; Heinanem, J. (2002). Nitrogen Fixation. En Kurlovich (Eds). *Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding*. St. Petersburg Pub. House; 269 -287.
- Larcher, W. (1995). *Physiological Plant Ecology*. (3ª Ed). Edit. Springer. Germany: 168-199.

- Lerat, E.; Morán, N. (2004). The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Mol Biol Evol.* 21(5): 903-913.
- McPeck, M. (2007). The Macroevolutionary consequences of ecological differences among species. *Palaeontology* 50 (1): 111–129.
- Milford, M.H., (1997). *Soils and Soils Science: Laboratory exercises.* (4th Ed.). Texas A&M University. Kendall/Hunt Pub. Com. (pp 345). Dubuque, Iowa. USA.
- Morgante, C.; Castro, S.; Fabra, A. (2007). Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. *Soil Biol. and Bioch.* Vol. 39(5):1222-1225.
- Primack, (2004). *Essentials of Conservation Biology.* pp (24-70). USA. Sinauer associates Inc Stepkowski, T.; Hughes, C.; Law, I.; Markiewicks, L.; Gurda, D.; Chlebicka, A.; Moulin, L. (2007). Diversification of Lupine Bradyrhizobium Strains: Evidence from Nodulation Gene Trees. *App. and Env. Microb.* Vol. 73(10): 3254-3264.
- Tupayachi, A. (2003). Especies de la flora lomal en el afloramiento geológico cretácico “Yuncaypata” en Urubamba: Cusco. *Cantua* 12: 22-26.
- Vincent, J. (1975). *Manual Práctico de Rhizobiología.* Buenos Aires, Argentina. Edit. Hemisferio.
- Wang, F.; Wang, T.; Liu, J.; Cheng, Sui, X.; Feng, W.; Chen, W. (2007). *Mesorhizobium albizae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int. Jour. Syst. & Evol. Mic.* 57: 1192-1199.
- WCMC. (2007). Databases & Maps. Disponible en URL: [http://www.unep-wcmc.org/forest/datasets\\_maps.htm](http://www.unep-wcmc.org/forest/datasets_maps.htm).
- Weir, B. 2007. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand of rhizobia Tesis PhD. School of Biological Sciences. The University of Auckland. New Zealand. 49-157. Disponible en URL: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.
- Wojciechowski, M.; Mahn, J. (2007). Diversity in Legume Root Nodules. Disponible en URL: <http://www.public.asu.edu/>.