

DIVERSIDAD GENETICA DE RHIZOBIA ASOCIADA A CUATRO LEGUMINOSAS ARBOREAS DEL NORESTE DE MEXICO

M. M. Martínez-Scott, V. Hernández-Hernández,
A. Palomo-Gil, J. Vásquez-Arroyo

Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna. Carretera a Santa Fe y Periférico, S/N. Apartado Postal 940, Torreón, Coahuila, 2700. México. Email: jvasquez@avantel.net; jvarroyo@campus.lag.itesm.mx.

RESUMEN

En el Noreste de México existe gran diversidad de leguminosas nativas utilizadas en baja escala como alimento del ganado caprino y ocasionalmente para el ganado vacuno. La rhizobia son bacterias del suelo que pueden formar nódulos, en los cuales se fija nitrógeno en las raíces de las plantas leguminosas de una manera específica. A estos microorganismos pertenecen los cinco géneros del dominio Bacteria: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* en la subdivisión alfa de las proteobacterias. Se determinó la diversidad genética de la rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas de la Región Noreste de México a través del empleo de la técnica de MLEE y Perfiles de plásmidos por la técnica de Eckhardt modificada. Un total de 249 nódulos fueron obtenidos de plantas de *Prosopis glandulosa* (74), *Acacia farnesiana* L. (97), *A. amentacea* L. (26) y *Leucaena leucocephala* (52). El 45% de los nódulos se perdió en el proceso de aislamiento. Los noventa y dos aislados fueron empleados para realizar el estudio de diversidad genética mediante enzimas: IDH, G6P, G2D, ALD, MDH y PGM. Se emplearon seis cepas de referencia *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN42^T), *R. tropici* II A (CFN-299^T), 73F (*Mesorhizobium* spp.) y 15P (*Sinorhizobium* spp. por definir, aislada de Acacia). Los resultados confirman una amplia diversidad genética de la rhizobia asociada a leguminosas arbóreas del Noreste de México (H=0.846) y un amplia diversidad de perfiles de plásmidos. Es probable que diferentes especies de rhizobia se encuentren asociadas a estas leguminosas.

Palabras claves: Ribotipificación, Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Prosopis*, Movilidad Electroforética de Enzimas, Perfiles de Plásmidos.

SUMMARY

In the Northeast of Mexico exists a great diversity of native leguminous that are used as forage for livestock (mainly for goat and occasionally for bovine). Rhizobia are soil bacteria that can form nodules, in which they fix nitrogen on leguminous plants in a host-specific way. These rhizobia belong to the five genera: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* in the alpha subdivision of the protobacterium. The objective of this study was to assess the genetic diversity of rhizobia associated to four leguminous trees of the northeast of Mexico through the MLEE and plasmid profile techniques. A total of 249 nodules obtained from plants of *Prosopis glandulosa* (74), *Acacia farnesiana* L. (97), *A. amentacea* L. (26) and *Leucaena leucocephala* (52). About a half of nodules was lost (45%) during the isolating process isolate technique. A total of 92 isolates were analyzed for the determinations of genetic diversity using six enzymes: IDH, G6P, G2D, ALD, MDH, PGM. The reference strains *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN42^T), *R. Tropici* II A (CFN-299^T), 73F (*Mesorhizobium* sp.) and 15P (*Sinorhizobium* sp. isolated from Acacia). The results confirm a wide genetic diversity of the rhizobia associated to leguminous trees in northeast of Mexico (H=0.846) and this is supported by the diversity of plasmid profiles found. Probably different species of rhizobia are associated to these leguminous.

Index Word: ribotyping, polymerase chain reaction, Acacia, *Prosopis*, Multilocus Enzyme Electrophoresis, Plasmid profile.

INTRODUCCION

La atmósfera contiene aproximadamente 10¹⁵ Tm de N₂ gaseoso, y el ciclo del nitrógeno involucra de manera global la transformación de aproximadamente 3x10⁹ Tm año⁻¹. Sin embargo, la transformación o fijación de N₂ no es exclusivamente biológica. Se estima que los relámpagos contribuyen con 10% del suministro mundial del N fijado. La industria de los fertilizantes también contribuye con una cantidad significativa de fijación química. La producción de N fijado por los

fertilizantes químicos contribuye con 25% y los procesos biológicos lo hacen con 60% (Zaharan, 1999). La fijación biológica del nitrógeno se define como el proceso de reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, realizada por organismos procariontes los cuales contienen el complejo sistema enzimático denominado nitrogenasa.

Las rhizobia, son bacterias del suelo que pueden formar nódulos en la raíz, en los cuales se fija nitrógeno en plantas leguminosas de una manera específica (Zhang *et al.*, 2000), estos organismos pertenecen a

cinco géneros del dominio Bacteria: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* en la subdivisión alfa de las proteobacterias (Terefevork, *et al.*, 1998).

Una eficiente simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, pasa a través de una serie de pasos iniciando con la colonización de la rizósfera de la planta por los microorganismos y terminando con la fijación biológica de nitrógeno (FBN) dentro de una nueva estructura anatómica, el nódulo. En el proceso de interacción simbiótica, se da un desarrollo específico entre el microsimbionte y la planta. Dicha especificidad es expresada en una etapa temprana del curso de la infección y resulta de múltiples interacciones de los productos de la bacteria y la planta.

Debido a los estudios de filogenia molecular que relacionan objetivamente a los microorganismos, las perspectivas de diversidad microbiana han mejorado enormemente en las dos décadas pasadas. Los árboles filogenéticos basados en las secuencias de genes, son mapas con los cuales se articula el concepto alusivo a la biodiversidad (Hungenholtz *et al.*, 1998). De esta forma, los análisis comparativos de la subunidad del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA; 16S o 18S) y otras secuencias de genes demuestran que la vida se coloca en tres principales dominios: Bacteria, Eucaria, y Archaea (Wose 1987; Wose *et al.*, 1990). La diversidad biológica, comprende a todas las especies de plantas, animales, microorganismos, al ecosistema y procesos ecológicos de los cuales forma parte. La diversidad genética, es la suma total de información genética contenida en los genes individuales de plantas, animales y microorganismos que habitan la tierra (McNeely *et al.*, 1990).

Se considera que los centros de origen y domesticación de las leguminosas, presentan los más altos niveles de diversidad genética de las especies de rhizobia correspondientes y, dentro de la enorme riqueza genética se podrán encontrar cepas capaces de fijar nitrógeno y nodular leguminosas en diferentes hábitat con una alta eficiencia (Souza *et al.*, 1994).

Los efectos de las prácticas de manejo del suelo sobre la diversidad microbiana no se conocen. Se ha sugerido que la agricultura crea un ambiente altamente selectivo y homogéneo que reduce la diversidad bacterial (Martínez y Caballero, 1996) y esto ha sido demostrado, ya que la aplicación de fertilizante a suelos sin fertilizar, lleva al decremento de la diversidad rhizobial en nódulos simbióticos de frijol (Caballero y Martínez, 1999). En estudios realizados en frijol sin fertilizar se ha encontrado una reducida diversidad genética ($H=0.105$), donde la sequía parecería ser una de las posible explicaciones

para dicho valor (Vásquez *et al.*, 1998). Una de las formas para demostrar la diversidad genética, es mediante el estudio de las variantes de movilidad electroforética de la actividad para múltiples enzimas; por consiguiente se consideró importante correlacionar ésta con la efectividad de las cepas bajo condiciones de invernadero (Martínez *et al.* 1991).

La familia leguminosa es una de las más grandes, agrupando unos 650 géneros y 18 mil especies (Carranza y Villarreal, 1997). En el Noreste de México existe una gran diversidad de leguminosas nativas que son utilizadas en baja escala como forraje para el ganado caprino y en algunos casos para el ganado vacuno; dentro de estas, las principales especies nativas se encuentra el "mezquite" (*Prosopis glandulosa* L.), el "huizache" (*Acacia farnesiana* L.), "chaparrio prieto" (*A. amentacea* L.) y la "leucaena" (*Leucaena leucocephala* L.) recientemente reintroducida y adaptada a la zona árida. Esta área corresponde a una superficie de 4'189,718 hectáreas de las cuales el 24% son de riego; para esta superficie, se requieren 200 mil toneladas de nitrógeno al año para satisfacer las necesidades de los cultivos. (Maldonado y Garza, 2000).

El explorar la vida microbiana asociada a la Rizosfera, tiene su fundamento científico y aplicación actual, éste se ha visto favorecido por los avances en las técnicas de la biología molecular que permiten conocer la distribución de los microorganismos dentro del ecosistema y ayudan a explicar las respuestas de crecimiento observadas en las plantas gracias a la producción de sustancias que actúan como promotoras de crecimiento vegetal, principalmente en las primeras fases de desarrollo. La fijación simbiótica de nitrógeno, por ser la única fuente de fertilización nitrogenada que no contamina, merece ser explorada como una alternativa para domesticar y mejorar el cultivo de las leguminosas.

El objetivo del presente trabajo fue estimar la diversidad genética de las poblaciones nativas de rhizobia, asociadas a cuatro leguminosas del Noreste de México mediante las técnicas de movilidad electroforética de enzimas (MLEE) y perfiles de plásmidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo. La recolección de nódulos en campo se realizó en los siguientes sitios de estudio, pertenecientes a los ejidos: El Retiro (R), Aquiles Serdán (A) San Pedro (S) [Del municipio de San Pedro Coah] y Monterrey (M) [Municipio de Monterrey, Nuevo León, México].

Análisis de suelo. El análisis físico-químico de los suelos correspondientes a los sitios de estudio, incluyó: potencial de hidrógeno (pH), densidad aparente (da), conductividad eléctrica (C.E.), contenido de macro (N, P y K) y micro elementos (Mg, Mn, Mo, B, Zn), clasificación de los suelos y contenido de materia orgánica (M.O.) de acuerdo con las especificaciones del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna.

Determinación de rizobia. La determinación del NMP (número más probable) se realizó mediante la técnica de inoculación en planta (Brockwell 1982), empleando *Phaseolus vulgaris* como cultivo trampa, debido a su gran precocidad para nodular y por su amplio rango de hospedera (Comunicación personal de la Dra. Esperanza Martínez-Romero, 2001). Centro de Fijación de Nitrógeno. UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.

Obtención de nódulos. Se realizó un muestreo en los sitios de estudio, conforme a las indicaciones establecidas por INIFAP del Estado de Nuevo León. El muestreo de plantas de "mezquite", "leucaena" y "huizache" fue en plantas con una altura de 1.5 a 2 metros, excavando alrededor de la raíz, extrayéndose toda la planta junto con la raíz. Del total de nódulos presentes, solamente se consideró para propósitos de estudio tomar el 15% de acuerdo con lo establecido por Moreira *et al.*, (1993). Los nódulos colectados de cada planta fueron depositados en tubos de ensaye conteniendo silica gel y conservados en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

Desinfección de nódulos. La esterilización de nódulos se llevo a cabo conforme lo establecen Somasegaran y Hoben (1985); se rehidrataron en agua destilada durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con alcohol etílico al 70% e hipoclorito de sodio al 25 % y se enjuagaron ocho veces con agua destilada estéril.

Aislamiento de rizobia. Cada nódulo desinfectado se trituró y sembró mediante estriado en placa con extracto de levadura y peptona (PY) (Vincent, 1975). La composición del medio por litro de agua fue: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona caseína y 15 g de agar (Noel *et al.*, 1984). Se agregó 1 ml de cloruro de calcio (0.14 mM, esterilizado por separado) por cada 100 ml del medio de cultivo, a los cuales se les adicionó 20 mg L⁻¹ del antibiótico cicloheximida (Caballero y Martínez, 1999) y las cajas fueron incubadas a 30°C. Al tercer día se procedió a reaislar la bacteria en PY conteniendo 20 mg L⁻¹ de ácido nalidíxico.

Inoculación de plantas. Para la autenticación de la rizobia mediante la inoculación de plantas se

usaron semillas de *Phaseolus vulgaris* las cuales fueron lavadas, desinfectadas y puestas a germinar sobre cajas Petri con agar-agua (1%) e incubadas a 30°C durante 36 horas. Las plántulas fueron inoculadas con cada uno de los aislados de rizobia obtenidos de plántulas del campo y se mantuvieron durante 20 días en contenedores de unicel de 2 L, los cuales fueron regados con una solución de Faraheus libre de N (10 ml de NaH₂PO₄ · 2H₂O, 10 ml de KH₂PO₄, 10 ml de CaCl₂, 10 ml de MgSO₄ · 7H₂O, 10 ml de citrato férrico y 1 ml de solución de elementos traza (Martínez *et al.*, 1985).

Caracterización de los aislamientos. El aislamiento de un microorganismo se define como el procedimiento mediante el cual una especie dada de microorganismo presente en una muestra particular se obtiene en cultivo puro, mientras que una cepa, se considera como una célula o población de células que tienen las características dadas de un tipo de microorganismo o de un género particular o especie. El análisis para la caracterización de los aislados de rizobia asociada a leguminosas arbóreas a nivel de cepas, fue a través del empleo de la movilidad electroforética de enzimas (MLEE) (Selander *et al.*, 1986) y perfiles de plásmidos por la técnica de Eckhardt, modificado por Wheatcroft *et al.* (1990).

Preparación de lisados rizobiales para MLEE. Se tomó una asada de cada uno de los aislados, los cuales fueron crecidos toda la noche en agitación continua a 250 rpm a 30°C en matraces conteniendo 50 ml de PY y 500 ml de cloruro de calcio (10 mM). Las células se cosecharon por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. Se preparó por separado la lisozima (1 mg ml⁻¹) conteniendo sulfato de magnesio 10 mM y se agregaron 50 ml a los tubos con el contenido de las células e incubándolas por 10 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se colocaron a -70°C por 10 minutos y finalmente se mantuvieron en hielo para trabajar.

La técnica de electroforesis en gel de almidón y tinción selectiva de enzimas aplicada para el estudio de la genética de poblaciones y sistemática de bacterias ha sido descrita previamente por Selander *et al.*, (1986). Se estudiaron seis enzimas con sus respectivos sistemas tampón, los cuales fueron: IDH, isocitrato deshidrogenasa (1.1.1.42); G6P, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (1.1.1.49) en tris-citrato pH 8.0; ALD, L-alanina deshidrogenasa (1.4.1.1) en tris acetato pH 7.5; MDH, NAD Malato deshidrogenasa (1.1.1.38), tris citrato pH 7.5.; GD, glutamato deshidrogenasa (1.1.1.46), tris, pH 8.0; PGM, fosfoglucomutasa (2.7.6.1), tris borato pH 8.2. Las diferentes variantes de movilidad, denominadas electroformas o electrotipos (ET's) para

cada enzima, se numeraron en orden decreciente de acuerdo a la movilidad, siendo igualadas en los alelos de los correspondientes locus de genes estructurales y perfiles de electroformas para las seis enzimas. Los ET's fueron comparados con los multilocus de los genotipos. Se elaboraron dendogramas, mediante la construcción de matrices de distancias, empleando el programa Unweighted Pair Group Method (UPGM) con medias aritméticas, proporcionado por la unidad de Ribotipificación. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

Cepas de referencia de rhizobia. Las cepas de referencia fueron proporcionadas gentilmente por la Dra. Esperanza Martínez Romero, de la unidad de Ribotipificación del Centro de Fijación de Nitrógeno de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos; México. Cepas de referencia: CFN42T *Rhizobium etli*, CFN299^T *R. tropici* tipo B, USDA06 B. japonicum, 73f (*Sinorhizobium* spp.) y 156^P (*Sinorhizobium* spp. por definir aislados de *Acacia farnesiana*) y *Sinorhizobium meliloti*.

Perfiles de Plásmidos. El total de 95 aislados de rhizobia obtenida de nódulos de plantas de las diferentes localidades en estudio, fueron analizadas para determinar sus perfiles de plásmidos mediante el procedimiento de Eckhardt (1978), modificado por Wheatcroft *et al.* (1990).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de suelo. En general, los suelos son pobres en N, característica necesaria para que se lleve a cabo la FBN. El mayor valor promedio lo presenta el sitio de "El Retiro"; así mismo se encuentran diferencias en el contenido de rhizobia, destacando el sitio de "San Pedro" con el valor más alto (28,200 rhizobia NMP g⁻¹ suelo). Cabe destacar para el sitio "San Pedro" los contenidos

en calcio (17.2 ppm), sodio (5.43 ppm) y Cu (2.02 ppm)(Cuadro 1).

Por los resultados obtenidos, el contenido de N en el ejido "El Retiro" de acuerdo a las tablas de Echevest indica que es rico en N, incluso en fósforo, lo cual podría afectar la simbiosis de la rhizobia según lo manifiestan Caballero y Martínez (1999). Sin embargo, las localidades "Aguiles Serdan" y "San Pedro" se consideran como medianamente pobres y como intermedios para fósforo. El éxito de un microorganismo en un hábitat dado depende del balance apropiado de éste y de la rápida respuesta fisiológica a las condiciones ambientales o experimentales (Aceves, 1983). De acuerdo a los resultados de Leidi y Rodríguez (2000), la formación de nódulos y tamaño de éstos se ve afectado por las concentraciones altas de N, sin embargo las concentraciones altas de fósforo favorecen el desarrollo de los nódulos. Algunas cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son sensibles a las altas concentraciones de sal, inhibiendo su desarrollo. La actividad de la fosfatasa y el rango de transporte del fosfato por *R. meliloti* se incrementa significativamente y se aumenta el número de nódulos, mientras que a niveles medios de fosfato, disminuye significativamente.

Recolección de nódulos en campo. Se considera que la nodulación es común en leguminosas, sin embargo algunas especies no pueden ser infectadas por la rhizobia y por consiguiente no puedan fijar nitrógeno (Terefework *et al.*, 1998). Diversas investigaciones indican que el 90% de los miembros de la subfamilia *Papilinoideae* y *Mimosideae* tienen la capacidad de nodular. En las *Cesalpinoideae* solo el 30% de los géneros nodulan; ésto demuestra que la fijación de nitrógeno es un factor frecuente pero no obligatorio. La interacción compatible entre la rhizobia y la leguminosa hospedera, culmina con la formación de una nueva estructura en la planta, el nódulo. La formación de nódulos

fijadores de N requiere de un proceso continuo de dos vías; el reconocimiento celular y de señales entre el microsimbionte y la planta. Tales procesos involucran la activación secuencial y/o represión de genes codificados por la planta y la bacteria (Michiels y Vanderleyden, 1994; Zhang *et al.*, 2000).

La *Leucaena* es uno de los géneros precoces que nodulan a partir de la cuarta semana y en general, las acacias comienzan a nodular a partir de los 45 días después de la siembra, mientras que el mezquite nodula tardíamente, a los 150 días en campo aun cuando presenta una gran variedad de desafíos en cambios fisiológicos, en respuesta a la pequeña disponibilidad de agua, baja concentración de nutrimentos en el suelo y altas temperaturas (Thomas *et al.*, 1995).

Se obtuvo un total de 97, 52, 74 y 26 nódulos de seis plantas de *Acacia farnesiana*, *Leucaena leucocephala*, *Prosopis glandulosa* y *A. amentacea*, respectivamente de los diferentes sitios de estudio.

Por el reducido número de nódulos encontrados en plantas, es posible que éstas presenten un inhibidor de la nodulación, más que un activador de la nodulación. Para el caso específico de frijol se ha demostrado que la bacteria dentro del nódulo es indispensable para que ocurra la supresión de la nodulación (Lafaye y Bordon, 1998). Cabe destacar que, aunque la bacteria penetre, la formación del nódulo no es automática. El aborto de los cordones de infección es común y varía dependiendo tanto del hospedero como de la bacteria. En algunas asociaciones, por lo tanto únicamente el 1.5% de los cordones de infección llegan a formar nódulos (las especies de este estudio podrían estar incluidas en ellas) y en otros casos estos valores pueden ser mucho más altos (Irving *et al.*, 2000).

Los ensayos de campo han demostrado que la nodulación se reduce, aun cuando los suelos presenten buenos niveles de humedad, lo que indica que no solo el agua es un factor determinante en la nodulación sino que también están involucrados otros factores bióticos y abióticos del suelo como el pH, arcillas, elementos químicos (nitrógeno, fósforo, azufre, etc.), materia orgánica, entre otros. De esta manera, el aumento de nódulos por planta es el resultado de cierta disponibilidad fisiológica-genética de la planta para presentar un mayor número de sitios a nodulación.

Aislamiento de rizobia asociada a leguminosas arbóreas. Del total de nódulos empleados para el aislamiento de rizobia (249), solamente se logró obtener 137 aislados (lo que implica que se tienen pérdidas del 45%). Este dato es de importancia práctica

para futuros experimentos, a fin de definir apropiadamente el número de nódulos por planta a seleccionar como representativos (10% fue el criterio utilizado, pero en el futuro, deberá ser del 20% considerando pérdidas de aislados del 50%) principalmente para este tipo de plantas de las cuales la información científica es limitada. Al respecto, existe divergencia en los reportes de la literatura, Caballero y Martínez (1999) mencionan que para el caso de frijol, cuatro nódulos por planta resultaron adecuados; Herrera *et al.* (1999), colectaron 1000 nódulos, de los cuales, solamente 39 aislados fueron empleados para la caracterización de especies, por su parte Martínez y Rosenblueth (1990) analizaron 20 nódulos de 10 plantas, para estudiar la competencia en nodulación en el cultivo de frijol.

Confirmación de rizobia. Una vez obtenidos los aislados a partir de nódulos, éstos fueron inoculados en plántulas de frijol como cultivo trampa, para confirmar su autenticidad, misma que a pesar de que resulte negativa (falta de nodulación), no deberá considerarse literalmente como que no pertenecen a rizobia, debido al hecho de que no necesariamente toda rizobia (y dada su amplia diversidad genética) deba nodular frijol. Por ser las hospederas de nodulación tardía los aislados pasarán al cepario rizobial para futuras investigaciones.

Diversidad Genética. La movilidad electroforética de enzimas es una de las técnicas más confiables para la identificación y caracterización de especies de rizobia; por lo tanto, su uso va más allá de la descripción de nuevas especies (Martínez, *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1991); y tiene aplicaciones en estudios de diversidad genética (Barrera, *et al.*, 1997; Caballero y Martínez, 1998; 1999); así como en la reclasificación de especies (Segovia *et al.*, 1993).

Los 92 aislados fueron analizados para determinar la diversidad genética (H), y se incluyeron las seis cepas de referencia empleadas en el estudio y 14 aislados repetidos que se intercalaron en los procesos, para confirmar la eficiencia de la electroforesis. De manera general para un total de 67 aislados de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas. Los valores de H fueron: 0.800, 0.864, 0.825 y 0.854, con un promedio de H=0.846 que es muy alto, lo que indica que prácticamente cada aislado que se obtenga, es una cepa diferente dentro de una misma planta y que varias cepas nodulan la misma hospedera, contrario a lo que se encuentra para frijol en un ambiente semiárido (H=0.105) (Vásquez, *et al.* 1998).

Por los resultados obtenidos, el total de ET's para los 67 aislados corridos fueron: 12, 9, 17 y 18,

respectivamente para cada dendograma, la mayoría de los ET's, solamente contienen un aislado, sin embargo, en el dendograma 2 (figura 2), se encontraron dos electrotipos con dos y tres aislados, respectivamente. Los aislados fueron obtenidos de Mezquite las localidades "Aguiles Serdán" (MA33, MA51) y Acacia de "San Pedro" (AS13) y Leucaena del Retiro (LR31a) y Chaparro prieto (CM44) que son cepas genéticamente idénticas y que se encuentran nodulando a plantas diferentes de la misma especie y plantas de diferentes especies, lo que demuestra el rango de hospederas de la rhizobia. En general es reconocida que la rhizobia son especies promiscuas con un amplio rango de hospederas (Terefework *et al.*, 1998).

Se considera que *Leucaena leucocephala* es una de las especies con más amplio rango de hospederas que se han encontrado. En investigaciones pasadas se pudieron identificar miembros de los géneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* asociados con *Leucaena leucocephala* (Martínez *et al.*, 1991; Lafaye y Burdon, 1998; Gao *et al.*, 1994). Estudios realizados con aislados de *Acacia* y *Prosopis* en Sudan y Kenya reportaron principalmente especies de *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Nick, *et al.*, 1999). En otros estudios se aislaron cepas de *rhizobia* asociada a *Acacia mangium* y de *Paraserianthes falcataria* de diferentes regiones de Indonesia, encontrando una asociación principal de *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. lupini* y *B. lianoningense*.

La rhizobia que nodula huizache es de crecimiento lento, que se asocia a *Bradyrhizobium*, pero también se encontraron especies de *Sinorhizobium* de crecimiento rápido (las colonias aisladas se obtuvieron en 24 h). Los aislados del presente estudio corresponden a cepas del tipo de crecimiento rápido (48 h), sin embargo, se requerirá de estudios posteriores para definir a la especie que pertenecen.

Perfiles de Plásmidos. En rhizobia, los plásmidos contienen más del 25% de la información genética (Martínez *et al.*, 1990) y el tamaño, así como la cantidad de plásmidos varía entre cepas. Usualmente el número de plásmidos presentes va de dos a 10 y el rango de peso molecular oscilan entre 30 y 1000 MDa.

Por definición, los plásmidos son material genético de DNA extracromosómico circular. Estos contienen genes que aumentan la capacidad de las

poblaciones bacterianas para colonizar y perdurar en el medio ambiente, pero no contienen genes para la supervivencia básica y la replicación de la bacteria (Haukka, 1997). El plásmido más estudiado es pSym; éste contiene los genes simbióticos para la nodulación y fijación de nitrógeno. Otros plásmidos, además del pSym pueden contener genes que son necesarios para la nodulación efectiva (Hynes y McGregor, 1990). Actualmente, se cuenta con reducida información respecto a los plásmidos en mesorhizobia (Zhang *et al.*, 2000). Bajo condiciones de laboratorio, se ha demostrado la transferencia de plásmidos y el pSym no es la excepción (Martínez y Caballero, 1996). También, se ha demostrado que el fenómeno existe de manera natural, como un proceso de evolución bacteriana, mediante la transferencia horizontal de genes, no solamente simbióticos sino también de resistencia a antibióticos y metales pesados entre otros.

CONCLUSIONES

De los resultados encontrados, se confirma la amplia diversidad genética, dado que no se encontraron aislados que presentaran el mismo perfil de plásmidos (para el caso de los aislados que los presentaron); quedaría la duda para aquellos aislados que no presentaron plásmidos, sin embargo, por MLEE, se demuestra que genéticamente son diversos.

Se encontró que de 28 aislados (26.7%) no presentaron plásmidos; 17 (11.3%), solo uno; 27 (25.7%), dos; 10 (9.5%), tres; 11 (10.5%), cuatro y dos (1.9%) con cinco plásmidos, incluyéndose en este último la cepa de referencia CFN42^T. Vale la pena destacar el hecho de que aislados que fueron obtenidos de un mismo nódulo (colonias aisladas en una misma caja Petri) por ejemplo AA31a y AA31b, la primera no presenta plásmidos mientras, que la última presenta cuatro, este hecho ocurrió de manera similar pero con diferente número de plásmidos en AA11a, AA1b; AR31, AR31b; CM62a, CM53b; esto probablemente indica que más de una cepa puede ocupar un mismo nódulo; hecho que experimentalmente se demostro para el cultivo de frijol.

De acuerdo con estos resultados, se concluye que existe una amplia diversidad genética de la rhizobia nativa asociada a leguminosas arbóreas del Noreste de México (H=0.864) y que es probable que diferentes especies de rhizobia se encuentren asociadas a las leguminosas arbóreas de la región Noreste de México.

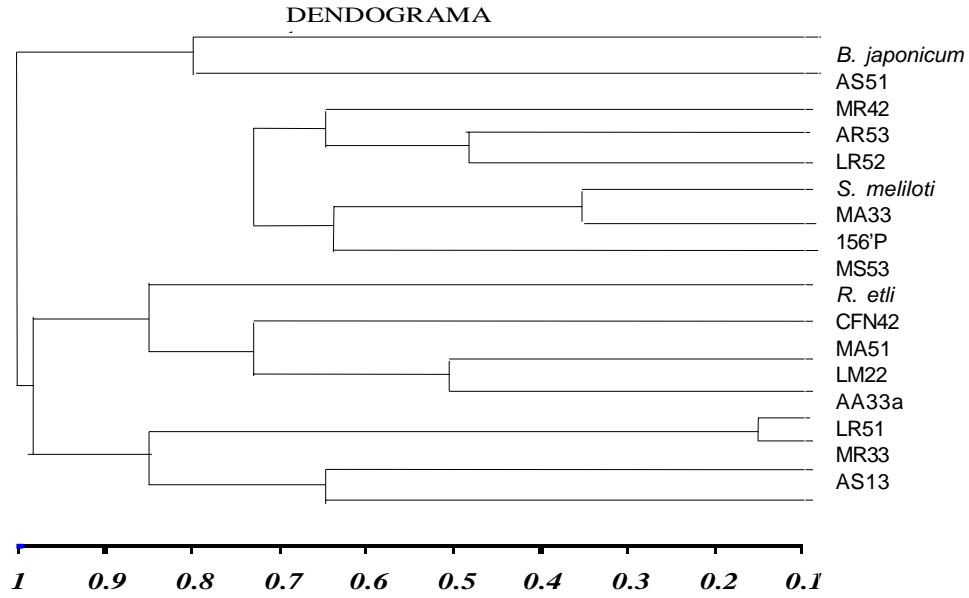


Figura 1. Dendrograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del Noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06) y *Rhizobium etli* (CFN 42^T).

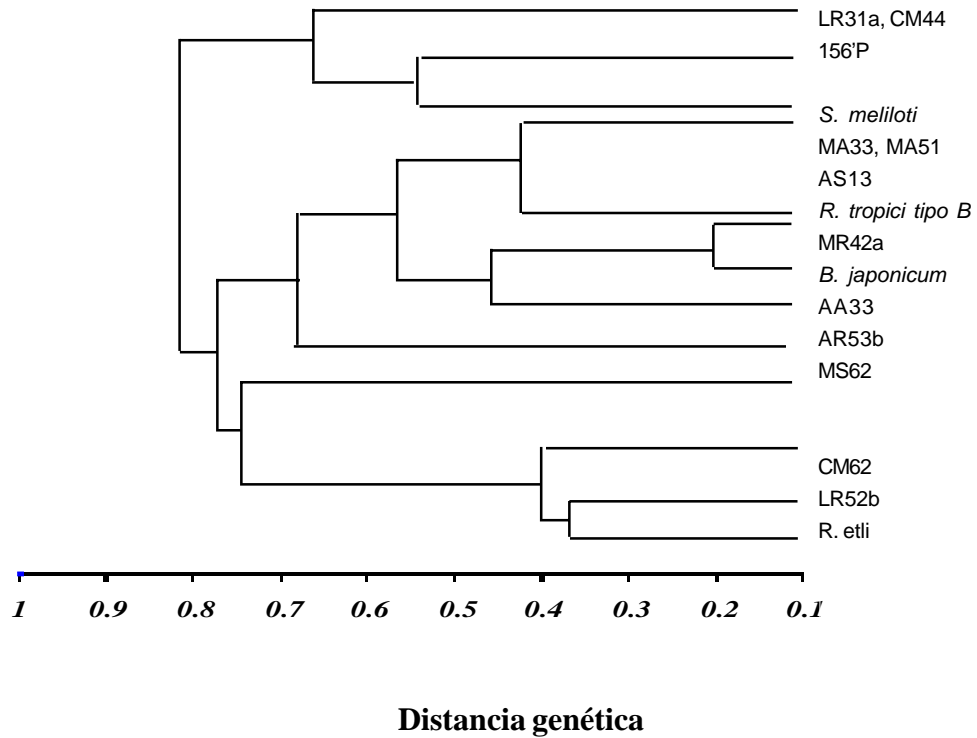


Figura 2. Dendrograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), *S. meliloti*, *R. tropici* tipo B (CFN-299^T) *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06) y *Rhizobium etli* (CFN 42^T).

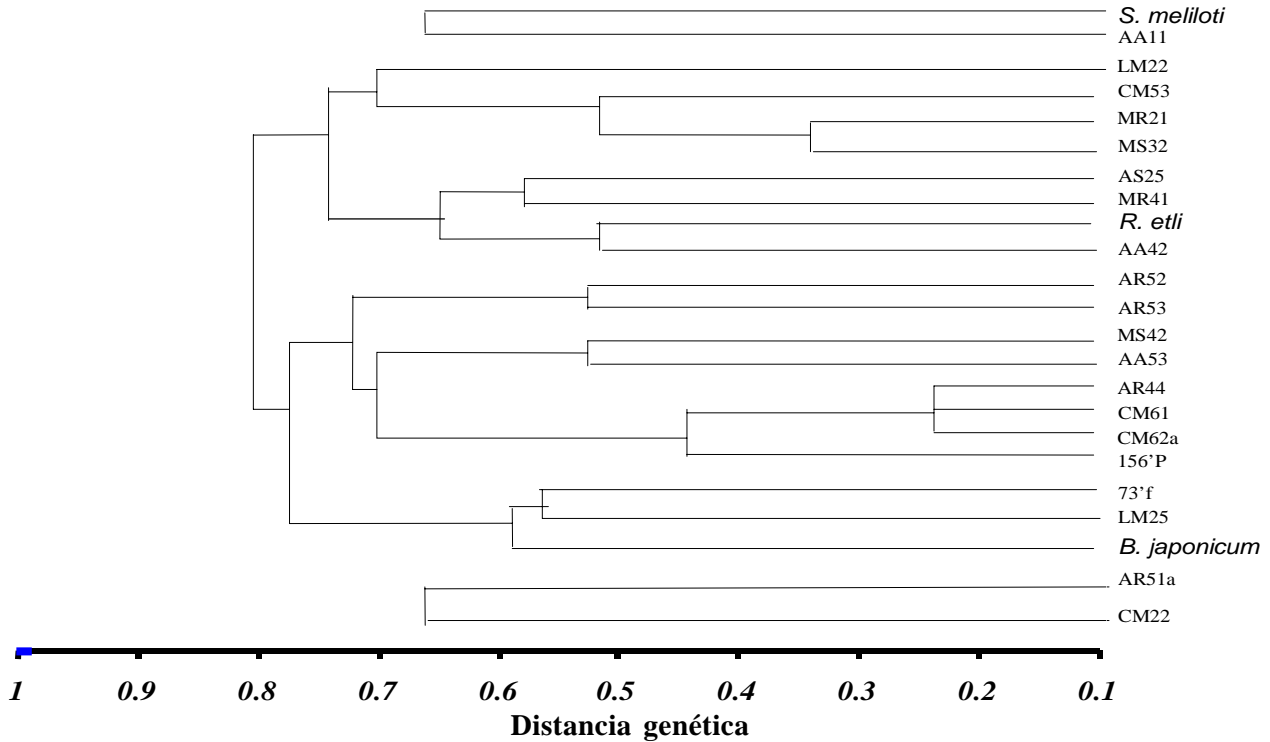


Figura 3. Dendrograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del Noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN 42^T), un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), 73'f (*Sinorhizobium* sp.) y *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06).

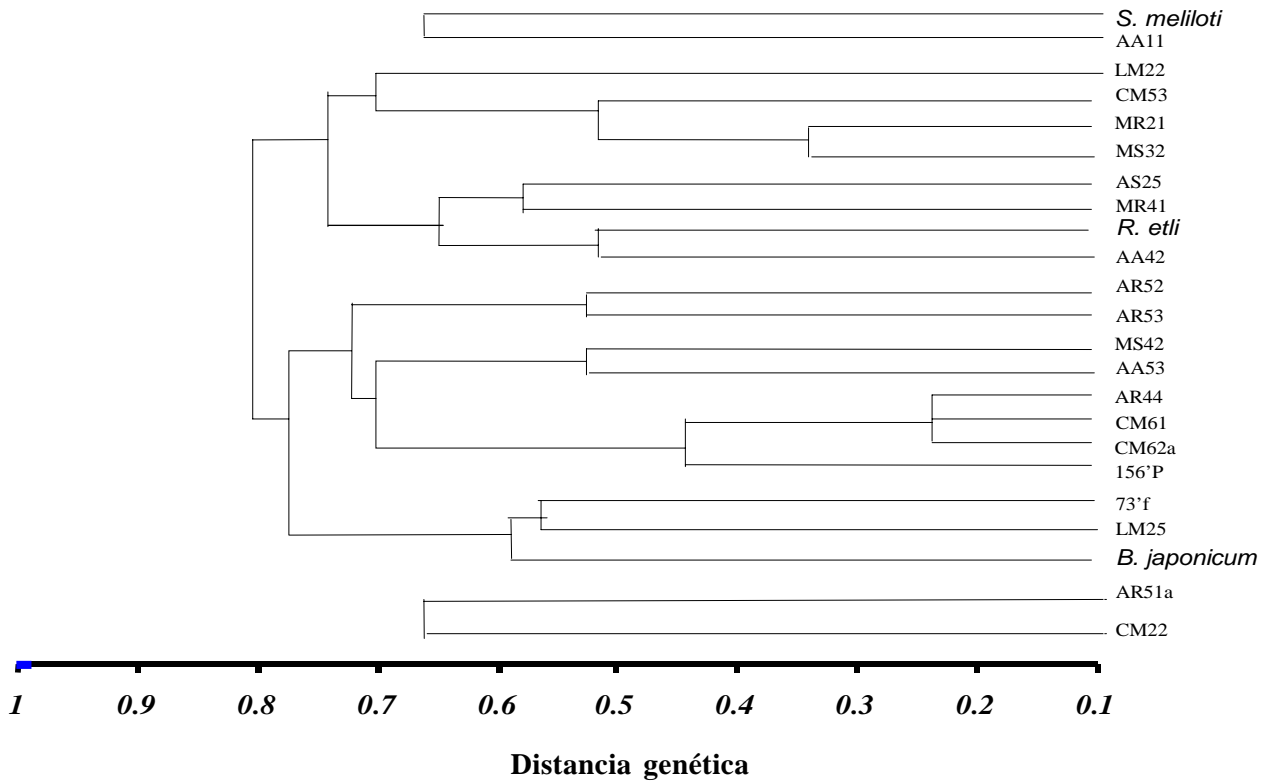


Figura 4. Dendrograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del Noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN 42^T), un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), 73'f (*Sinorhizobium* sp.) y *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06).

LITERATURACITADA

- Aceves Orozco, A. 1983. Tasa de crecimiento de *Rhizobium* en medio de cultivo, suelo y rizosfera. Tesis Lic. F. C. B. UANL. Monterrey, N. L. p. 6-12.
- Barrera, L. L.; M. E. Trujillo.; M. Goodfello; F. J. García.; I. Hernández Lucas.; G. Dávila.; P. Van Berkum y E. Martínez Romero. 1997. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. System. Bacteriol.* 47:1086-1091.
- Brockwell, J. 1982. Application of legume seed inoculants. A treatise of dinitrogen fixation. p. 277- 309.
- Caballero Mellado, J. y E. Martínez-Romero. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity. *Simbiosis* 26:111-121
- Carranza P, M. A y J. A. Villarreal Q. 1997. Leguminosas de Coahuila, México. Claves y Descripciones de Especies. UAAAN. Saltillo Coah., México. p 1-58.
- Gao, J. L.; J. G. Sun.; L., T. Wang y X. Chen. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 44:151-158.
- Haukka, K. 1997. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Doctoral Dissertation. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki. Helsinki, Finland.
- Herrera Cervera, J. A.; J. Caballero Mellado; G. Laguerre; H. V. Tichy; N. Requena; N. Amarger; E. Martínez Romero; J. Olivares y J. Sanjuan. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:87-97.
- Hugenholtz, P.; B.M. Goebel y N. R. Pace. 1998. Minireview: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765-4774.
- Hynes, M. F. y N. F. McGregor. 1990. Two plasmid than nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4:567-574.
- Irving, H. R.; N. M. Boukli.; N. M. Kelly y W. J. Broughton. 2000. Nod-factors in symbiotic development root hairs. In root hairs. *Cell and Molecular biology*. R. W. Ridge, A. M. C. Emons, eds. Springer-Verlag. Tokyo, Japan. 15:241-265
- Lafaye, B. y J. J. Burdon. 1998. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in south-eastern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3989-3997.
- Leidi, E. O. y D. N. Rodríguez Navarro. 2000. Nitrogen and phosphorous availability limit N₂ fixation in bean. *Res. New Phytol.* 147:337-346.
- Maldonado Aguirre, L. J y F. E. De la Garza P. 2000. El Mezquite en México rasgos de importancia productiva y necesidades de desarrollo. En: Frías Hernández J. T., V. Olalde-Portugal y E. J. Vernon-Carter (Eds). *El Mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México.* Universidad de Guanajuato, México. p 37-50.
- Martínez Romero, E.; M. A. Pardo., R. Palacios y M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
- Martínez Romero, E. y Caballero Mellado, J. 1996. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:113-140.
- Martínez Romero, E. y M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2384-2388
- Martínez Romero, E.; F. Segovia.; F. Martins Mercante., A.A. Franco.; P. Graham y M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
- McNeely, J.A.; K.R. Miller; W.V. Reid; R.A. Mittermeir y T.B. Werner. 1990. Conserving the world's biological diversity. World Bank. Washington.
- Michiels J. y J. Vanderleyen. 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N₂-fixing root nodule. *World J. Microbiol. Biotech.* 10:612-630.
- Moreira F., M. S.; M. Gilis.; B. Pot; K. Kersters y A. A. Franco. 1993. Characterization of rhizobia isolated from deferent divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 135-146 p.
- Nick, G.; P. Lajudie de; B. D. Eardly; S. Suomalainen; L. Paulin., X. Zhang., M. Gillis y K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous tree in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1359-1368,
- Noel, K. D., F. Sánchez; L. Fernández; J. Leemans, y M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- Segovia, L. D.; R. Piñero; R. Palacios y E. Martínez Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426- 433.
- Selander, R. K.; D. A. Caugant.; H. Ochman.; J. M. Musser; M. N. Gilmour y T. Whittam. 1986. Methods of Multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:873-884.
- Somasegaran, P. y H. J. Hobell. 1985. *Methods in Legume-Rhizobium technology.* NifTal Hawaii. USA.

- Souza, V., L. Eguiarte; G. Ávila; R. Cabello; C. Gallardo; J. Montoya y D. Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* bv *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. Appl. Environ. Microbiol. 60:1260-1268.
- Terefework, Z.; G. Nick; S. Suomalainen, L. Paulin y K. Lindström. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:349-356.
- Thomas, P. M.; F. Kouakou; R. Golly; A. Virginia y J. W. Zyskind. 1995. Cloning of nod gene regions from mesquite rhizobia and bradyrhizobia and nucleotide sequence of the nodD gene from mesquite rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. 61:3422-3429.
- Vásquez Arroyo, J., A. Sessitsch; E. Martínez Romero y J. J. Peña Cabriales. 1998. Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* sp on different cvs. of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil. 204:147-154.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Wheatcroft, R.; D. G. McRae y R. W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect super coiled plasmid during bacteroid development. Mol. Plant Microbe Inter. 3:9-17.
- Wose, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271.
- Wose, C. R.; O. Kandler y M. L. Wheelis 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87:4576-4579.
- Zaharan, H.H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol. Biol. 63:968-989.
- Zhang, X. X.; S. L. Turner; X. W. Guo; H. J. Yang; F. Debelle; G. P. Yang; J. Denarie; J. P. Young y F. D. Li. 2000. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. Appl. Environ. Microbiol. 66:2988-95.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo recibido al trabajo de colaboración proyecto externo SIREYES, a cargo del Ing. Lorenzo Jaime Maldonado Aguirre. Clave 19980606017: "Distribución y Caracterización de plantas nativas del noreste de México y su capacidad de establecer simbiosis con bacterias y actinomicetos fijadores de nitrógeno atmosférico".

Al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, México. En especial a la Dra. Esperanza Martínez Romero por las facilidades otorgadas y al valioso apoyo para la realización de los ensayos moleculares.

Al Dr. Ricardo Trejo Calzada, Profesor Investigador URUZA-UACH., por sus aportaciones y recomendaciones para una mejor interpretación de los resultados del presente trabajo.