

R-12903

T 980

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Caracterización de cepas de *Sinorhizobium*
aisladas de suelos brasileños**

Memoria que presenta la licenciada
en Farmacia RAQUEL BEATRIZ
GÓMEZ COCA para optar al examen
de licenciatura en la modalidad
de tesina.

Sevilla, 1998

UBS 1174324

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Caracterización de cepas de *Sinorhizobium*
aisladas de suelos brasileños**

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada en Farmacia RAQUEL BEATRIZ GÓMEZ COCA para optar al examen de licenciatura en la modalidad de tesina.

Los Directores



Fdo.: Manuel Megías Guijo



Fdo.: Mariangela Hungria

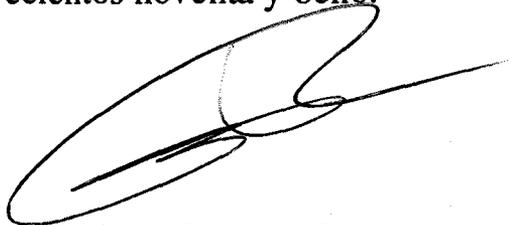


Fdo.: Raquel B. Gómez Coca

**D. DIEGO GUEVARA BENÍTEZ, CATEDRÁTICO Y
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA: Que la tesis de licenciatura titulada "Caracterización de cepas de *Sinorhizobium* aisladas de suelos brasileños" presentada por D^a RAQUEL BEATRIZ GÓMEZ COCA para optar al examen de licenciatura en la modalidad de tesinas, que ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla bajo la dirección del Dr. D. Manuel Megías Guijo y la Dra. D^a Mariangela Hungria.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a veintinueve de octubre de mil novecientos noventa y ocho.



Fdo.: Dr. D. Diego Guevara Benítez

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Microbiología, pero de manera especial a las siguientes personas:

A mi mejor amiga, mi madre, que día a día me enseña que nada es imposible, por su constancia, su inagotable paciencia, y su fe en mí.

A Pepe Ríos, por "soportar" mi mal humor, compartir mis ilusiones y ser alguien muy importante en mi vida.

Al Dr. Manuel Megías Guijo, mi director de tesis de licenciatura , que me ha dado la oportunidad de entrar en un mundo fascinante.

A Manyani Hamid, por ser un gran compañero de trabajo y un buen amigo.

A la Dra. Carolina Sousa, por su inestimable ayuda, su determinación y su apoyo.

A todos mis compañeros, por los buenos ratos compartidos, sus consejos y sus palabras de ánimo.

A mi abuela

A mis padres

A mi hermano

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

aa	aminoácido
ác.	ácidos
Al	aluminio
bv.	biovariedad
C	carbono
Ca	calcio
Cd	cadmio
Cm	cloranfenicol
cm	centímetros
Co	cobalto
col.	colaboradores
Cr	cromo
c.s.p.	cantidad suficiente para
c.u.	cada unidad
Dr.	doctor
Eri	eritromicina
g	gramos
Gm	gentamicina
H	hidrógeno
H ₂ O dest.	agua destilada
K	potasio
Km	kanamicina
l	litros
M	molaridad
Mg	magnesio
mM	milimolar
mg	miligramos
min.	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros

mn.	minerales
nm	nanómetro
N	nitrógeno
Nod	fenotipo de nodulación
P	potasio
Pb	plomo
pm	picomoles
Rif	rifampicina
r.p.m.	revoluciones por minuto
Se	selenio
sp.	especie
spp.	especies
Str	estreptomicina
Tc	tetraciclina
μ	micras
μg	microgramos
μl	microlitros
\emptyset	diámetro
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
=	igual a
>	mayor que
<	menor que
\geq	mayor o igual que
\leq	menor o igual que
%	porcentaje

ÍNDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCIÓN	1
1. La fijación biológica del nitrógeno. Repercusiones económicas y ecológicas	2
2. Las leguminosas	4
3. Interacción planta-microorganismo	5
4. Secuencia temporal del proceso de nodulación	6
5. Genes bacterianos involucrados en el proceso de infección	10
6. La molécula señal	11
7. Tipos de nódulos	15
8. La soja y sus microsimbiontes	16
9. Taxonomía de los rizobios	18
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS	27
A. Manipulaciones bacterianas	28
1. Bacterias utilizadas	28
2. Medios, condiciones de cultivo y conservación de las cepas	28
3. Congelación de cepas	35
4. Antimicrobianos y productos químicos añadidos a los medios de cultivo	36
B. Ensayos y procedimientos realizados	41
1. Aislamiento de variedades de microorganismos de crecimiento rápido aislados de nódulos de soja obtenidos de suelos brasileños	41
1.1. Estudio de la morfología de las colonias	47
1.2. Estudio del tiempo de replicación	47
1.3. Estudio de la acidificación del medio YM	48
1.4. Estudio de la acidez y la alcalinidad	48
1.5. Tolerancia a la salinidad y a temperaturas altas	49
1.6. Estudio del crecimiento en LB y síntesis de melanina	49
1.7. Estudio de la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno	50

1.8. Estudio de la resistencia intrínseca a antibióticos y metales pesados	50
1.9. Análisis genético con los cebadores específicos ERIC y REP utilizando la técnica de PCR	51
2. Grupos de análisis para la realización de la taxonomía numérica	52
3. Extracción y purificación de ADN total	54
4. Electroforesis en geles de agarosa	54
IV. RESULTADOS	56
1. Aislamiento de variedades de microorganismos de crecimiento rápido aislados de nódulos de soja obtenidos de suelos brasileños	57
1.1. Morfología de las colonias.	60
1.2. Tiempo de generación de las diferentes estirpes	60
1.3. Acidificación de medio YM	62
1.4. Tolerancia a la acidez y la alcalinidad	62
1.5. Tolerancia a la salinidad y a temperaturas altas	63
1.6. Crecimiento en LB y síntesis de melanina	65
1.7. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	65
1.8. Resistencia intrínseca a antibióticos y metales pesados	68
1.9. Análisis genético con cebadores ERIC y REP mediante PCR	72
2. Dendograma fenético general	76
V. DISCUSIÓN	79
VI. CONCLUSIONES	85
VII. REFERENCIAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		<u>Página</u>
1	Etapas del proceso de nodulación	7
2	Estructuras básica de la molécula señal	13
3	Mapa de América del Sur	42
4	Localización de los campos situados en cinco estados brasileños y en el Distrito Federal	43
5	Regiones del Estado de Paraná	44
6	Dendograma en el que se muestran similitudes fenotípicas de estirpes de sinorrizobios brasileños, teniendo en cuenta el uso de 41 compuestos como únicas fuentes de carbono o nitrógeno	67
7	Dendograma en el que se muestran similitudes fenotípicas de estirpes de sinorrizobios brasileños, teniendo en cuenta los datos de resistencia a tres concentraciones de antibióticos y los de tolerancia a tres concentraciones de cinco metales pesados	71
8	Dendograma en el que se muestran las similitudes fenotípicas de treinta estirpes de sinorrizobios brasileños, con los datos de tolerancia a tres concentraciones de metales pesados	74
9	Dendograma fenotípico mostrando las similitudes entre sinorrizobios brasileños utilizando 81 parámetros	75
10	Dendograma generado a partir del análisis genético con cebadores ERIC y REP mediante PCR	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		<u>Página</u>
1	Sustituyentes de los factores de nodulación producido por diversos rizobios	14
2	Clasificación actual de los rizobios	21
3	Estirpes de bacterias utilizadas	29
4	Localización y tipos de cultivos de los suelos utilizados para el aislamiento de sinorizobios	45
5	Propiedades químicas de los suelos	46
6	Número de estirpes de rizobios de crecimiento lento y rápido	58
7	Suelos de origen y genotipo de la planta trampa	59
8	Características morfológicas y tiempos de generación de las 30 estirpes estudiadas	61
9	Tolerancia a la acidez y a la alcalinidad	63
10	Tolerancia a la salinidad, altas temperaturas, crecimiento en medio LB y síntesis de melanina	64
11	Uso de fuentes de carbono	66
12	Uso de fuentes de nitrógeno	69
13	Resistencia a antibióticos	70
14	Tolerancia a metales pesados	73

I. INTRODUCCIÓN

-
1. Fijación biológica del nitrógeno. Repercusiones económicas y ecológicas.
 2. Las leguminosas.
 3. Interacción planta-microorganismo.
 4. Secuencia temporal del proceso de nodulación.
 5. Genes bacterianos involucrados en el proceso de infección.
 6. La molécula señal.
 7. Tipos de nódulos.
 8. La soja y sus microsimbiontes.
 9. Taxonomía de los rizobios.
-

I. INTRODUCCIÓN

1. Fijación biológica del nitrógeno. Repercusiones económicas y ecológicas.

El nitrógeno es un importante constituyente de la materia orgánica, formando parte de moléculas tan importantes para la vida como las proteínas o los ácidos nucleicos.

En la mayoría de los ecosistemas, el crecimiento de las plantas y su desarrollo viene limitado por el nitrógeno disponible, por lo que se recurre a la adición de fertilizantes a los suelos, para así aumentar el rendimiento de las cosechas, ya que, a pesar de ser el gas más abundante en la atmósfera (79% de la misma) no puede ser asimilado como tal por los vegetales superiores, sino que debe ser previamente transformado a compuestos inorgánicos del tipo de los nitratos y el amonio. El proceso mediante el cual el nitrógeno molecular atmosférico pasa a su forma combinada es conocido como fijación biológica del nitrógeno.

Con la intensificación de la agricultura, las exigencias de nitrógeno por parte de las plantas son cada vez mayores. Para mantener fértiles las tierras de cultivo, son necesarios 200 millones de toneladas de nitrógeno por año, las cuales son suministradas principalmente mediante la fijación biológica y fertilizantes químicos aunque también puede proceder de la descomposición de la materia orgánica; además existe también una pequeña contribución como consecuencia de la reacción de descargas eléctricas sobre el nitrógeno, que implica la síntesis de nitrato; esto representa tan solo un 4% de la entrada positiva del balance de nitrógeno en la tierra.

La utilización y pérdida de nitrógeno forman un ciclo complejo denominado " ciclo del nitrógeno ".

La fijación biológica del nitrógeno es de gran importancia porque es un suministro directo de nitrógeno atmosférico a la planta, evitándose el uso de fertilizantes nitrogenados. Para cada tonelada de amonio (fertilizante) fabricada, son necesarios seis barriles de petróleo; además de las ventajas económicas que conlleva la fijación biológica de nitrógeno, y de la disminución de la dependencia de nitrógeno mineral del suelo total o parcialmente, también hay ventajas ecológicas, porque se ahorra petróleo y gas natural, que son fuentes energéticas no renovables. Por otra parte se evita el riesgo de contaminación, con nitratos, de los ríos y las aguas subterráneas, causada por la lixiviación de los fertilizantes, dada su alta solubilidad en agua. Todo esto favorece un desarrollo económico sostenido y no contaminante.

El mayor potencial biológico de reserva de nitrógeno se encuentra en la atmósfera. Este potencial es un 1,2% del nitrógeno total de la Tierra, aunque el nitrógeno gaseoso equivale al 79% de la atmósfera. Ninguna especie vegetal o animal puede por ella misma utilizar el nitrógeno atmosférico como fuente de N_2 , debido al triple enlace existente entre los dos átomos que forman la molécula; dicho enlace es uno de los más fuertes que se conocen en la naturaleza. Por otro lado, los vegetales solo usan el 40% del nitrógeno mineral asequible en el suelo, lo que viene a ser un 3% del nitrógeno total del suelo.

La fijación simbiótica de nitrógeno es más baja que la cantidad de nitrógeno asimilado de los minerales del suelo, pero representa el 8.5% del consumo total de nitrógeno de la planta, debido a la alta eficacia de la transferencia de este nitrógeno fijado a la misma.

Los fertilizantes aportan una cantidad de nitrógeno equivalente al 50% del que aporta la fijación biológica del nitrógeno, pero debido a la eficacia de la transferencia, la planta solo consume un 2%.

El nitrógeno atmosférico puede ser fijado por una gran diversidad de microorganismos, pero solo si éstos establecen una relación íntima con las plantas,

pueden fijar cantidades de nitrógeno lo suficientemente grandes como para mejorar de forma apreciable el crecimiento de éstas.

La interacción microbio-planta puede presentarse de tres formas:

- 1) relación directa planta (o célula vegetal)-parásito obligado, lo cual origina enfermedades tales como las royas,...
- 2) interacción que produce tumores (agallas).
- 3) asociación mutualista *Rhizobium*-leguminosa, para la fijación de nitrógeno mediante la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas.

2. Las leguminosas.

Las leguminosas abarcan 700 géneros distintos de plantas, con 14000 especies, pero la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno no se han detectado todavía en la mayor parte de ellas.

Actualmente en el mundo, la mayoría de los cultivos de leguminosas reciben nitrógeno mediante fertilizantes.

En el guisante, judía, soja, y otras leguminosas grano, la fijación de nitrógeno es mucho menor que en otras leguminosas forrajeras, tales como alfalfa y trébol.

La leguminosa grano suele depender del nitrógeno del suelo, pero la cantidad a la que tienen acceso es menor al 50% del total requerido. Es importante indicar que en suelos con nitratos se inhiben la formación de nódulos.

En Brasil, el cultivo de la soja es importante, porque parte de su economía está sustentada por la exportación de semillas y productos industriales, y por el papel creciente que la soja viene ocupando como suplemento proteico de su población.

3. Interacción microbio-planta.

La obtención de mutaciones puntuales, proceso facilitado por la disponibilidad de transposones, así como la posibilidad de complementación entre mutantes, ha facilitado el curso de las investigaciones, permitiendo la identificación de los genes responsables de la interacción y su expresión en relación con el hospedador.

Se conocen modelos donde la enfermedad o simbiosis mutualista (beneficiosa) aparece por un intercambio de señales establecido entre los dos miembros de la asociación.

El carácter de resistencia a la infección del hospedador, y el carácter de infectividad del simbiote, son controlados por la combinación de los genotipos de ambos.

Las interacciones planta-microbio están determinadas por la producción por el parásito de factores de compatibilidad o de sensibilidad del hospedador a ellos y factores de incompatibilidad. Los factores que determinan la compatibilidad causan cambios en la fisiología del hospedador, que hacen que sea susceptible a la infección.

La resistencia que previene la acción de los factores de compatibilidad requiere la ganancia de una función (un nuevo factor) para que se establezca. La incompatibilidad o interacción gen a gen, se da cuando un gen concreto del parásito interacciona con un gen particular del hospedador, determinando la resistencia a la infección. Puede parecer que la susceptibilidad a la infección o compatibilidad, es una actitud activa del parásito frente a la pasiva del hospedador, pero se ha descrito la interacción compatible, en la que los genes del parásito controlan la producción de factores de compatibilidad en el hospedador, que alteran su fisiología, para permitir la colonización por tal parásito. La interacción entre sus genes puede conducir a la interacción incompatible o incompatibilidad.

Mucho de estos factores han sido caracterizados, como por ejemplo los de la situación beneficiosa *Rhizobium*-leguminosa; en este caso se dan ambos sistemas, interacción compatible, e incompatible o nodulación específica de genotipo.

Es interesante el significado que tiene el concepto de avirulencia en la interacción incompatible planta-patógeno, porque aquí, la expresión de los correspondientes genes es perjudicial para el parásito, ya que impide el establecimiento de un sistema compatible, beneficioso para el mismo.

Para que un organismo saprófito se convierta en parásito, debe ser capaz de penetrar, crecer y multiplicarse en el hospedador; esta adaptación podrá ser más o

menos complicada.

Primero existe un intercambio de señales que determina la compatibilidad o incompatibilidad del sistema, si se da simbiosis mutualista, este intercambio de señales sirve para un reconocimiento mutuo, y permite una infección controlada, gracias a la expresión de gran cantidad de genes, tanto de la planta como del microorganismo, que al final conlleva a una mejor nutrición de la misma; este es un caso de compatibilidad controlada.

Las leguminosas controlan la producción de fitoalexinas. Las fitoalexinas son compuestos de acción antimicrobiana exudados por la planta para impedir el desarrollo de los rizobios cuando, por mutación, no puede expresar adecuadamente los genes implicados en la nodulación. Las fitoalexinas son de bajo peso molecular y de naturaleza fenilpropanoidea; se derivan de la desaminación de la fenilalanina por la PAL (fenilalanina amonioliasa); también interviene la chalcona sintasa, que es activada por la presencia de microorganismos patógenos. Cuando la intercomunicación planta-microorganismo no es la adecuada, la actividad metabólica de la planta se reconducirá hacia la síntesis de fitoalexinas, para controlar la infección. El hospedador puede hacerse resistente a la infección porque cambie o se inactive el factor de compatibilidad.

Cuando la planta es sensible al factor de compatibilidad, la resistencia puede deberse a una reacción de hipersensibilidad a los factores de incompatibilidad del patógeno. La reacción de hipersensibilidad es una respuesta defensiva de la planta frente a patógenos (virus, bacterias, hongos o nematodos). Consiste en la muerte celular rápida alrededor del lugar donde está el patógeno, limitándose así la multiplicación del mismo; además, se acumularán compuestos antimicrobianos, depósitos de callosa, lignina, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y depósitos de proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis).

4. Secuencia temporal del proceso de nodulación.

El mecanismo mediante el cual los rizobios entran en contacto con las células meristemáticas de la planta hospedadora y las infectan se conoce como proceso de infección, el cual se caracteriza por un intercambio recíproco de señales específicas entre ambos simbiosis. Las etapas de que consta dicho proceso se esquematizan en la Figura 1 y son las siguientes:

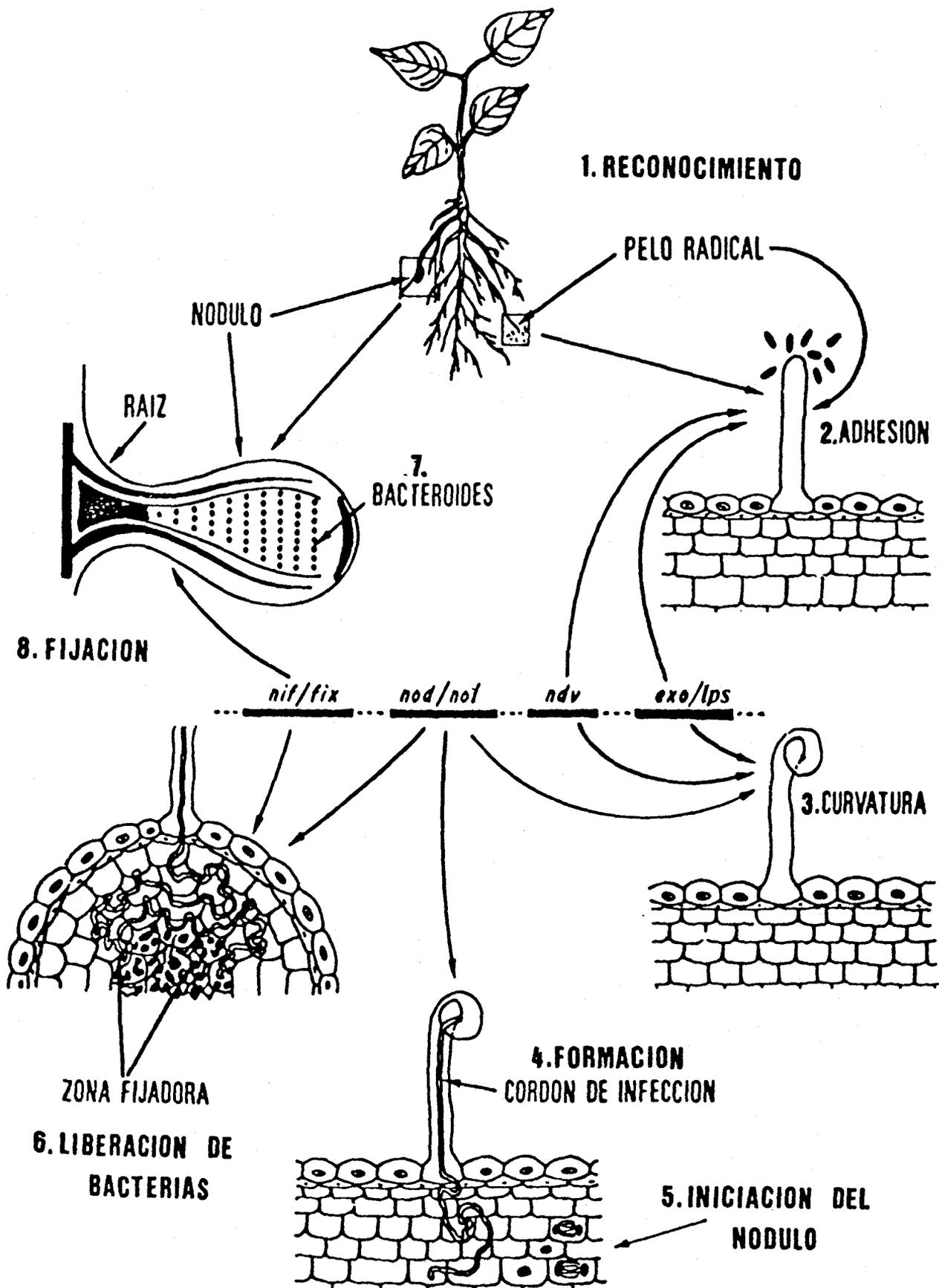


Figura 1: Etapas del proceso de infección en la simbiosis Rhizobiaceae-leguminosas.

4.1. Reconocimiento bacteria-planta

Los rizobios presentes en la rizosfera de la leguminosa son atraídos quimiotácticamente hacia las raíces de la planta hospedadora por diversos compuestos de los exudados radicales, principalmente hidrato de carbono, aminoácidos y ácidos dicarboxílicos, aunque en el caso de *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti*, también han sido identificados como quimioatrayentes algunos flavonoides (Aguilar y col., 1988; Dharmatilake y Bauer, 1992).

4.2. Adhesión bacteriana

Una vez que los rizobios han tomado contacto con la raíz de la planta pueden darse varias alternativas para la infección. El método más difundido es a través de la unión de las bacterias a las puntas de los pelos radicales en fase de elongación, como ocurre en alfalfa, arveja o frijol, aunque en otro grupo minoritario de leguminosas la iniciación del nódulo puede ocurrir mediante fisuras, penetrando las bacterias a través de espacios intercelulares en la epidermis o en la lámina media, caso del cacahuete.

Bajo condiciones limitadas de carbono, la unión de los rizobios a los pelos radicales se puede dividir en dos etapas: la primera etapa está mediada por el calcio, a través de una pequeña proteína de la superficie bacteriana que se une a dicho ion, denominada richadhesina. La segunda etapa es la formación de los agregados bacterianos, que está mediada por fibrillas extracelulares de celulosa, también producidas por los rizobios, y no esenciales para la nodulación (Smit y col., 1987). Otro elemento que puede intervenir son unas proteínas, denominadas lectinas, localizadas en las fimbrias o en la superficie celular. Cuando el carbono no constituye un factor limitante, están implicadas otras lectinas, en esta ocasión producidas por la leguminosa, que se unen a hidratos de carbono, habiendo sido propuestas como determinantes de la especificidad de hospedador en la simbiosis *R. leguminosarum* bv. *trifolii* - trébol y *B. japonicum* - soja.

4.3. Deformación y curvatura de los pelos radicales.

Seguidamente, una señal difusible de la bacteria, la molécula señal, causa la deformación del pelo radical y su posterior curvatura, adquiriendo éste la forma característica de "cayado de pastor".

4.4. Formación de un foco de infección y crecimiento del cordón de infección.

La bacteria prolifera y penetra por el pelo radical, probablemente después de una disolución parcial muy localizada de la pared celular vegetal. En el punto de

contacto con los rizobios, la pared del pelo radical se invagina para formar una estructura tubular, conocida como "cordón de infección", que crece a través de la célula del pelo radical, en dirección al córtex, en un proceso coordinado por el citoesqueleto de dicha célula en asociación con el núcleo. Más tarde las bacterias se multiplican a lo largo del cordón de infección en crecimiento.

4.5. Iniciación del nódulo.

Antes y durante el crecimiento del cordón de infección, los rizobios inducen la división de las células del córtex de la raíz para formar el primordio nodular, el cual se desarrolla hasta meristemo nodular, donde posteriormente se formará el nódulo maduro.

La punta del cordón de infección, precedida por el núcleo de la célula del pelo radical, emigra hacia el meristemo recién desarrollado, donde comienza a ramificarse y extenderse, penetrando en las células de dicho tejido e introduciendo a los rizobios en el interior de la planta.

4.6. Liberación de las bacterias.

En el extremo del cordón de infección, las bacterias son liberadas al citoplasma de las células vegetales del córtex de la raíz, por un proceso similar al de la endocitosis.

4.7. Desarrollo del bacteroide.

Tras esta liberación las bacterias se diferencian hasta bacteroides, que son bacterias modificadas, de mayor volumen y sin pared celular, siendo el proceso el siguiente:

- a) comienza con la endocitosis de las bacterias, que quedan englobadas en sacos membranosos ("membrana peribacteroidal") derivados del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico de la célula meristemática. Es la etapa de más íntimo contacto entre bacteria y planta, separadas sólo por esta membrana, que constituye una interfase esencial para el intercambio de metabolitos y nutrientes entre bacteria y planta.
- b) los bacteroides se multiplican. Normalmente, la división de los bacteroides va inmediatamente seguida de la división de la membrana peribacteroidal, con lo cual no suelen encontrarse más de dos bacteroides por membrana.
- c) se detiene la división celular
- d) se elimina la pared celular de los bacteroides
- e) comienza la síntesis de leghemoglobina por ambos simbioses. La leghemoglobina proporcionará un ambiente microaeróbico (aunque los rizobios son aerobios)

obligados); tal proteína proporcionará el oxígeno necesario al bacteroide, evitando derroches de energía y el posterior funcionamiento desmesurado de la nitrogenasa, enzima altamente sensible a este elemento. Controla el metabolismo del bacteroide.

f) puesta en marcha de la maquinaria metabólica necesaria para la reducción de dinitrógeno a amonio, es decir, activación de la transcripción de los genes *nif* y *fix*, que codifican a la enzima nitrogenasa, su regulación y una serie de proteínas implicadas en el aporte electrónico requerido para su funcionamiento.

4.8. Fijación del nitrógeno.

Es llevada a cabo por los bacteroides maduros. El bacteroide está funcionando en una situación de estrés, por lo que a este nivel todavía puede darse incompatibilidad en la asociación, y formarse bacteroides no fijadores de nitrógeno, en cuyo caso el nódulo ya formado senescerá rápidamente.

5. Genes bacterianos involucrados en el proceso de infección.

La endocitosis y la formación de bacteroides es un punto de no retorno en la asociación, y una vez en él, ninguno de los asociados puede detener el proceso de infección. En todo este proceso existe un continuo intercambio de señales por los dos organismos a modo de conversación inteligente, ya que la formación de nódulos requiere la expresión de genes tanto de la bacteria como de la planta.

Aunque siguen sin estar claros los mecanismos que permiten a la bacteria invadir las células de la planta sin inducir sus sistemas de defensa, se han identificado dos grandes grupos de genes en el rizobio de gran importancia en los procesos de infección y formación de nódulos (Martínez y col., 1990), conocidos como genes tempranos y tardíos:

5.1. Genes tempranos. Se expresan durante las primeras etapas de la nodulación.

Por una parte encontramos los llamados genes *nod*, *nol* y *noe* o de nodulación, que no se transcriben en ausencia de la planta hospedadora

Por otra parte aparecen los genes que determinan las estructuras superficiales de los rizobios y que pertenecen a tres tipos diferentes (Kannenberg y Brewin, 1994):

a) genes *exo* responsables de la síntesis de exopolisacáridos (EPS), que forman parte de la matriz del cordón de infección, donde actúan como secuestrantes de iones Ca, modificando el patrón de ensamblaje de la pared celular vegetal. También podría ser una señal difusible que inicie el desarrollo del cordón de infección. En asociaciones patogénicas los EPS son fundamentales para el movimiento de la bacteria por los tejidos vegetales, su crecimiento entre la células, la evasión frente a las defensas de la planta y el desarrollo de la enfermedad.

b) genes *lps*, cuya expresión permitirá la producción del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa. Este compuesto puede impedir la liberación de metabolitos bacterianos que provoquen la reacción de defensa de la leguminosa, o bien puede actuar como molécula señal de bajo peso molecular, o como oligosacárido, que estimule la reacción simbiótica o inhiba la respuesta patogénica.

c) genes *ndv*, causantes de la formación de glucanos cíclicos, que se acumulan preferentemente en el espacio periplásmico, donde puede que actúen como protectores osmóticos, manteniendo la presión apropiada durante el proceso de infección.

5.2. Genes tardíos. Son los genes *nif* y *fix*, responsables de la fijación de nitrógeno.

6. La molécula señal.

Para los cinco géneros de la familia Rhizobiaceae fijadores de nitrógeno, ha podido constatarse la existencia de pequeñas moléculas de naturaleza lipooligosacáridica capaces de provocar en la planta hospedadora, en pequeñísimas concentraciones, muchas de las respuestas biológicas previamente atribuidas a la bacteria en sí. Dichas moléculas se denominan factores de nodulación o molécula señal y tienen un importante papel en las primeras etapas de la formación del nódulo.

El proceso sería como sigue:

- a) la planta segrega una serie de flavonoides que activan a la proteína NodD.
- b) la proteína NodD activa la transcripción de los genes *nod* implicados en la síntesis de factores de nodulación reconocidos por la planta.

Los genes *nod* pueden dividirse en comunes, que son iguales en todas las especies de rizobios, y en específicos, que como su nombre indica son característicos de cada especie, e incluso, de cepas.

Los factores de nodulación son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina, N-acilados en su extremo no reductor por un ácido graso de diferente longitud y grado de insaturación. Dependiendo del tipo de simbiosis, este oligómero tendrá unas u otras sustituciones, tanto en su extremo reductor como en el no reductor. Tanto estas sustituciones como el tipo de ácido graso de la molécula son los responsables de la especificidad de los factores de nodulación. (Figura 2, Tabla 1).

En la síntesis de estos compuestos con estructura lipo-oligosacáridica, los genes *nod* comunes son los responsables de la síntesis del oligómero de quitina acilado, que es común en todos los factores, mientras, los genes *nod* específicos serán los que introduzcan la incorporación de los distintos residuos en los extremos reductor y no reductor, los cuales hacen que la planta hospedadora reconozca a "su" bacteria específica.

Cantidades del orden de picomoles de estos factores son suficientes para el reconocimiento, dando lugar a la deformación y curvatura de los pelos radicales, inducción de los focos meristemáticos y comienzo de la formación de los canales de infección. Tales compuestos tienen la categoría de fitohormonas, y pueden ser sintetizados por la planta, de aquí que los factores Nod producidos por la bacteria se consideran imitaciones de compuestos vegetales naturales que pueden ser reguladores del crecimiento del propio vegetal, dando lugar a nódulos en ausencia del simbionte, aunque se desconoce el papel de los mismos.

La producción de distintos factores de nodulación es también el mecanismo responsable de las interacciones incompatibles; se habla de nodulación específica de genotipos, en la cual un único gen vegetal es el responsable de que un cultivar no pueda ser nodulado por su rizobio en principio, específico, y en la que en la bacteria la incompatibilidad es también debida a un solo gen.

Hay genes *nod* que actúan impidiendo la transcripción de otros genes *nod*, responsables de la interacción incompatible. De esto se deduce que cada cepa bacteriana tiene una determinada carga de genes *nod*, en base a la cuál se producirá un perfil específico de factores, los cuales pueden ser inhibidores (y no habrá nodulación, lo cual conlleva a la incompatibilidad), o estimuladores.

La producción de factores nod inhibidores da lugar a lo que se conoce como restricción de la nodulación específica de genotipos (GSN), y es un ejemplo del sistema gen a gen que opera en la interacción planta-patógeno.

Además de los genes *nod*, son muy importantes los genes que determinan las estructuras superficiales del microsimbionte, ya que, durante la formación del nódulo,

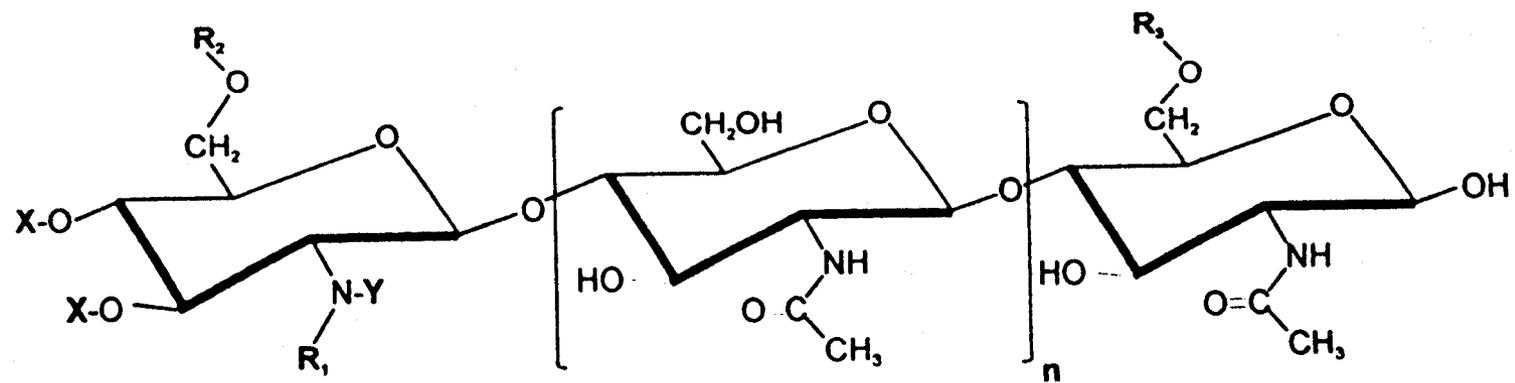


Figura 2: Estructura básica de la molécula señal.

Tabla 1: Sustituyentes de los factores de nodulación producidos por diversos rizobios.

Especie productora	n	R ₁	R ₂	R ₃	X	Y	Referencia
<i>A. caulinodans</i>	2,3	C18:0 ó C18:1	-H o -CO-NH ₂	D-arabinosa o -H	-H	-CH ₃	Mergaert y col., 1993
<i>B. japonicum</i>	3	C18:1, C16:0 ó C16:1	-H o -CO-CH ₃	2-O-metilfucosa o -H	-H	-H	Sanjuan y col., 1993
<i>R. fredii</i>	1,2,3	C18:1	-H	fucosa o 2-O-metilfucosa	-H	-H	Bec-Ferté y col., 1993
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	2,3	C18:4 ó C18:1	-CO-CH ₃	-H	-H	-H	Spaink y col., 1991
<i>R. loti</i>	3	C18:1 ó C18:0	-H	4-O-acetilfucosa	-CO-NH ₂	-CH ₃	López-Lara y col., 1994
<i>R. meliloti</i>	1,2,3	C16:2 ó C16:3	-H o -CO-CH ₃	-SO ₃ H	-H	-H	Lerouge y col., 1990 Schultze y col., 1992
<i>R. tropici</i>	2,3	C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 ó C16:2	-H	-SO ₃ H o -H	-H	-CH ₃	Poupot y col., 1993 Folch, 1994
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	3	C18:1 ó C18:0	-CO-CH ₃	2-O-metilfucosa 3-O-sulfatada o 4-O-acetilada	-CO-NH ₂	-CH ₃	Price y col., 1992

n: n° de unidades de N-acetilglucosamina centrales; R₁: ácido graso; R₂: hidrógeno, carbamilo o acetilo; R₃: hidrógeno, sulfato o azúcar; X: hidrógeno o carbamilo; Y: hidrógeno o N-metilo.

el contacto físico entre la bacteria y las células vegetales es cada vez más íntimo; esto hace que en el desarrollo del proceso de nodulación, la bacteria tenga que adaptarse para poder sobrevivir en el interior de la planta, lo que incluye la evasión de las posibles respuestas de defensa del huésped. Cualquier fallo de la bacteria en su adaptación a los sucesivos nichos ecológicos ofrecidos por la planta, desencadenará la respuesta defensiva de ésta, y la bacteria será tratada como patógeno en vez de como simbiote.

De esto se deduce que los genes proporcionan las estructuras superficiales al microorganismo, son un grupo bien definido y esenciales para la simbiosis, ya que sin dichas estructuras, el resultado final sería la obtención de nódulos carentes de bacterias. Se ha de tener en cuenta que a veces hay nódulos que contienen bacterias mutantes, que han perdido algunos polisacáridos, lo que hace pensar que estos no son los únicos que determinan la especificidad del hospedador.

7. Tipos de nódulos.

Los nódulos que se forman en las raíces de las leguminosas pueden ser de dos tipos:

A. Nódulos indeterminados: cilíndricos, de elongación continua, con meristemo celular, y sin interconexión de los haces vasculares en el extremo apical del mismo. Este tipo de nódulo es formado, por ejemplo, en alfalfa y guisante.

B. Nódulos determinados: esféricos, con actividad meristemática transitoria, sin meristemo nodular, y con los haces vasculares fusionados en el extremo apical del nódulo. Es el caso de soja y judía.

Aunque la formación de un tipo u otro de nódulo depende de la planta (una bacteria puede formar nódulos determinados en una leguminosa concreta e indeterminados en otras), parece ser que la presencia del LPS es esencial en el caso de la infección que da lugar a nódulos de tipo determinado, mientras que no es importante si son de tipo indeterminado. La ausencia o alteración del polisacárido o del LPS no permite una formación correcta de canales de infección, y, aunque ésta llegara a darse, no sería posible la endocitosis de las bacterias por las células vegetales, ni la formación de bacteroides.

Igualmente, la síntesis de un EPS ácido es esencial para la formación de canales de infección.

Los glucanos cíclicos son elaborados por todos los miembros de la familia Rhizobiaceae. Según la bacteria, estos glucanos serán necesarios para la virulencia o para la infección y correcto desarrollo del nódulo; su ausencia conlleva la pérdida de motilidad y de adhesión a las células vegetales.

8. La soja y sus microsimbiontes.

La soja (*Glycine max* (L) Merrill) es considerada uno de los cultivos más antiguos del mundo, los informes de su cultivo en la República Popular China son de alrededor del 2500 aC. El origen primario genético de *G. soja* Sieb. y Zucc., el ancestro de *G. max*, está en el valle del río Yangtze, en el norte y noreste de las provincias de China, cerca de Rusia, Corea y Japón; con la emigración a Manchuria, esta región llegó a ser el centro secundario de origen (Morse, 1950; Hymowitz, 1970).

En Brasil, el cultivo fue introducido probablemente hacia 1882, en el Estado de Bahía, como *Soja hispida* (D'utra, 1882). Durante las siguientes décadas se hicieron algunas pruebas en algunas zonas experimentales agronómicas brasileñas, pero fue sólo en la década de los 40 cuando los cultivos comerciales de *G. max* fueron establecidos en la región sur del país, con una considerable expansión de las áreas de soja después de los 60. Hoy el cultivo se está extendiendo por todo el país, ocupando alrededor de 12 millones de hectáreas y produciendo más de 23 millones de toneladas de granos, haciendo del país el segundo mayor productor de soja del mundo (Hungria y col., 1994; Vargas y Hungria, 1997). Los suelos brasileños estaban originalmente libres de variedades de bradirrizobios de soja (Freire, 1977; Vargas y Suhet, 1980), por lo tanto, cuando los cultivos comerciales a gran escala comenzaron, en los años 60, los inoculantes fueron exportados de Estados Unidos. Hoy, más del 90% de la soja crece en áreas previamente inoculadas que contienen una población adaptada en la que predominan las cepas más competitivas traídas en los inoculantes usados en las décadas pasadas (Hungria y col., 1994; Vargas y Hungria, 1997).

Las bacterias capaces de nodular de forma eficiente con soja fueron clasificadas, desde 1932 a 1980, como *Rhizobium japonicum* (Fred y col., 1932; Buchanan, 1980). En 1982 fueron reclasificadas en un nuevo género, como

Bradyrhizobium japonicum ("bradus", del griego, significa "lento"), aludiendo a las características de una baja velocidad de crecimiento y reacción alcalina en medio conteniendo manitol y extracto de levadura (medio YM) (Jordan, 1982).

En los años siguientes, varios estudios han mostrado diferencias entre variedades dentro de esta especie, llevando a una subdivisión en una segunda especie, *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall y col., 1992).

Mientras tanto, en 1982, algunas variedades de rizobios de soja, caracterizadas por un crecimiento rápido y reacción ácida en medio YM, fueron aisladas de nódulos de suelos en la República Popular China (Keyser y col., 1982). Más tarde, otras especies de crecimiento rápido fueron aisladas de centros de origen genético primario y secundario, por ejemplo, en la República Popular China, Malasia y Vietnam (Xu y Ge, 1984; Dowdle y Bolhlool, 1985; Young y col., 1988; Rodríguez-Navarro y col., 1996).

Las bacterias de crecimiento rápido fueron inicialmente clasificadas como *Rhizobium fredii* (Scholla y Elkan, 1984) y más tarde reclasificados como *Sinorhizobium fredii* (Chen y col., 1988; La Judie y col., 1994). Estudios iniciales han mostrado que estirpes de *S. fredii* fueron capaces de establecer una simbiosis efectiva, con nódulos fijadores de nitrógeno, exclusivamente con el genotipo ancestral de soja, *G. soja*, y con los cultivos primitivos o no mejorados, tales como Pekín y varios genotipos asiáticos, siendo inefectivas e incapaces de nodular en cultivos comerciales de Norteamérica (Keyser y col., 1982; Stowers y Eaglesham, 1984; Devine, 1985).

Sin embargo, posteriormente se ha visto que varios genotipos norteamericanos también fueron capaces de formar nódulos efectivos con *S. fredii* estirpe USDA257 (Balatti y Pueppke, 1992).

En los últimos cinco años, se ha realizado el aislamiento de bacterias de nódulos de soja recogidos en distintas áreas brasileñas, y se ha identificado variedades de crecimiento rápido y reacción ácida en medio YM. Un análisis de 80 cultivos de soja utilizados u obtenidos mediante programas de mejora de cultivos de soja brasileños, mostraron que el 67% podía formar nódulos efectivos con *S. fredii* estirpe USDA205 y CCBAU114 y con *S. xinjiagensis* CCBAU105 (Clueire y Hungría, 1997).

9. Taxonomía de los rizobios.

Al mismo tiempo que Hellriegel demostraba la importancia fisiológica de los nódulos de las raíces, los microbiólogos estudiaron el organismo causante. Frank (1879) examinó los nódulos y, como otros, pensó que el simbiote era un hongo, al que dio el nombre de *Schinzia leguminosarum*. Cuando Beijerinck (1888) aisló la bacteria del nódulo de la leguminosa, la llamó *Bacillus radiciola*, pero en 1889 Frank cambió el nombre por *Rhizobium leguminosarum*, siendo esta denominación la que actualmente se utiliza.

En 1932 Fred, Baldwin y McCoy reconocieron seis especies de *Rhizobium*::

- Rhizobium leguminosarum*, que nodula en las raíces de *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* y *Lens*.
- Rhizobium trifolii* que nodula en las raíces de *Trifolium*.
- Rhizobium phaseoli* que nodula en las raíces de *Phaseolus*.
- Rhizobium meliloti* que nodula en las raíces de *Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*.
- Rhizobium japonicum* que nodula en las raíces de *Glycine max*.
- Rhizobium lupis* que nodula en las raíces de *Lupinus*.

Esta clasificación se mantuvo hasta 1982. El rango de hospedadores fue un factor importante en la definición de estas especies, por lo que Fred y col. (1932) también describieron diferencias morfológicas y fisiológicas.

La idea de que los rizobios pudieran separarse en especies claramente definidas según sus rangos de hospedadores y, a la inversa, que las leguminosas pudieran ser agrupadas en base a simbioses mutuamente intercambiables, llegó a ser conocida como "inoculación cruzada", concepto que fue puesto en duda repetidamente en décadas posteriores por científicos que encontraron rangos de hospedador que se superponían.

De todas formas, estuvo claro que los rizobios eran muy diversos, tanto en rango de hospedador como en propiedades fisiológicas, y que existía alguna correlación entre ambos parámetros.

Gradualmente fueron acumulándose evidencias para clasificación nueva que no estaba basada explícitamente en el rango de hospedadores. En particular, había una serie de estirpe de crecimiento lento en medios de laboratorio que mostraron toda una serie de propiedades distintas. Eventualmente, Jordan en 1982 propuso que estas estirpes fueran agrupadas en un nuevo género llamado *Bradyrhizobium*. Esto abrió la era moderna, que ha visto como los cambios en la nomenclatura siguen avanzando

hasta hoy en día. El impulso para las investigaciones ha venido de la mano de la introducción de nuevas técnicas dignas de confianza para la evaluación de similitudes y diferencias entre bacterias.

Primero, la introducción de la taxonomía numérica suministró la pauta para la combinación de datos fisiológicos, morfológicos, serológicos, etc., y una forma menos rigurosa y subjetiva que dio medidas cuantitativas de similitud. Luego las técnicas moleculares introdujeron nuevas y abundantes fuentes de datos, primero con hibridaciones de ADN y electroforesis de proteínas, y luego con otros métodos de ADN, que culminaron en la secuenciación.

Taxonomía y filogenia actuales

La fuente de datos más abundante para la clasificación de los rizobios, así como para otros grupos de bacterias, ha sido la secuenciación de los genes que codifican la subunidad pequeña del ARN ribosómico (ARNr 16s).

En un tiempo relativamente corto desde la primera secuenciación parcial del ARN de los rizobios por Young, Downer y Eardly (1991), se han publicado datos más extensos de secuenciación de esta subunidad para las estirpes tipo de cada una de las especies aisladas.

Sin duda, los datos de secuenciación de la subunidad 16s del ARNr han llegado a ser una parte importante en la descripción de cualquier nueva especie bacteriana y de su estudio filogenético, por lo que al menos 3000 especies bacterianas han sido objeto de estas técnicas, lo que permite que las nuevas secuencias puedan ser inmediatamente situadas en un rico contexto. Para el estudio de la taxonomía bacteriana, el impacto de los datos de secuenciación molecular ha sido revolucionario porque existen pocos caracteres seguros previos para la reconstrucción filogenética. En contraste, las relaciones evolutivas de muchos eucariotas fueron razonablemente bien conocidas a partir de evidencias morfológicas antes de la llegada de las técnicas moleculares.

No obstante, la secuenciación de ADN está proporcionando cada vez más nuevas ideas en la evolución eucariota, y son especialmente importantes para grupos en los que la evidencia morfológica es pobre.

Los datos de ARN apoyan la existencia de una subdivisión bien establecida de los rizobios en tres géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Young y col., 1991; Willems y Collins, 1993; Yanagi y Yamasato, 1993), todos dentro de la subdivisión alfa de las Proteobacterias, pero distribuidas en ramas bastante distintas, cada una de las cuales incluye un número considerable de especies bacterianas que no son rizobios.

Actualmente son reconocidas 17 especies, en cuatro géneros (Tabla 2), pero de hecho son probables órdenes de magnitud aún menores que el número real de especies de rizobios (utilizando criterios bacteriológicos convencionales basados en el grado de relación del ADN). El número de especies de *Rhizobium* podría ser incluso similar al número de especies de leguminosas, actualmente estimado en unas 18000. Aunque la mayoría de las bacterias aisladas pueden nodular en hospedadores de distintas especies, es cierto que varias especies bacterianas son a menudo aisladas de una única especie de leguminosa, y que solo unas pocas leguminosas han sido investigadas a fondo.

-género *Azorhizobium*

Azorhizobium caulinodans nodula tanto en el tallo como en la raíz de *Sesbania rostrata*, y es la única especie mencionada de este género (Dreyfus, García y Gillis, 1988), aunque una segunda especie ha sido reconocida por ensayos de hibridación ADN-ADN (Rinaudo y col., 1991). *Azorhizobium* tiene muchas propiedades distintas a otros géneros, incluyendo la secuencia de ARNr 16s, lo que le confiere su estatus de género separado, con una única especie.

-género *Bradyrhizobium*

Su taxonomía actualmente es confusa. Todas las estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulan eficazmente en soja eran hasta hace poco conocidas como *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), aunque se ha reconocido que son demasiado variadas como para encajarlas dentro de una única especie. Kuykendall y col. (1992) propusieron el nombre de *Bradyrhizobium elkanii* para un segundo grupo de estirpes noduladoras en soja, pero las estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* son aún muy diversas y es necesario reconocer entre ellas especies muy alejadas. Otra especie, *Bradyrhizobium liaoningense*, ha sido propuesta recientemente, ya que es distinta según el criterio de hibridación de ADN-ADN, teniendo además una tasa de crecimiento excepcionalmente lento. De todas formas sólo está disponible una secuenciación parcial del ARNr 16s. También existen algunas estirpes que claramente pertenecen a *Bradyrhizobium*, pero que no nodulan en soja, y para las cuales no se ha definido especie, por lo que son conocidas como *Bradyrhizobium sp.*, seguidas por el nombre del género de leguminosa hospedadora. Eventualmente estas estirpes necesitan ser asignadas a *Bradyrhizobium japonicum* o *Bradyrhizobium elkanii* o a otras especies, en base a la similitud del conjunto de sus características genéticas, ya que no resulta satisfactorio excluirlas sólo en base a su rango de hospedadores.

-género *Rhizobium*

Ha estado claro durante varios años que *Rhizobium*, si incluye todos los rizobios que no son *Bradyrhizobium* o *Azorhizobium*, es demasiado amplio para ser

Tabla 2. Clasificación actual de las especies de rizobios.

Rhizobium

-*Rhizobium leguminosarum*

 bv. *viciae*

 bv. *trifolii*

 bv. *phaseoli*

-*Rhizobium tropici*

-*Rhizobium etli*

Sinorhizobium

-*Sinorhizobium meliloti*

-*Sinorhizobium fredii*

-*Sinorhizobium saheli*

-*Sinorhizobium teranga*

otro género

-[*Rhizobium galegae*]

Mesorhizobium

-[*Rhizobium*] *loti*

-[*Rhizobium*] *huakuii*

-[*Rhizobium*] *tianshanense*

-[*Rhizobium*] *mediterraneum*

Bradyrhizobium

-*Bradyrhizobium japonicum*

-*Bradyrhizobium elkanii*

-*Bradyrhizobium liaoningense*

Azorhizobium

-*Azorhizobium caulinodans*

un único género. Los datos de ARNr 16s sugieren que este género podría ser subdividido en otros cuatro, basados en las actuales especies de *Rhizobium leguminosarum* (la especie tipo), *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium loti* y *Rhizobium galegae*; son grupos claramente separados, con similitudes y diferencias en determinadas propiedades. Las estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli* están relacionadas, y deberían recordar al género *Rhizobium*. *Agrobacterium* biovariedad 2 (ahora llamado *Agrobacterium rhizogenes*) también pertenece a este grupo filogenéticamente, por lo que puede que en un futuro sea transferido al género *Rhizobium*.

-género *Sinorhizobium*

De LaJudié y col. (1994) han propuesto que la rama que incluye a *Rhizobium meliloti* y a *Rhizobium fredii* fuera transferida al género *Sinorhizobium*. Este género fue inicialmente propuesto por Chen, Yan y Li (1988) para enfatizar la diferencias entre *Rhizobium fredii* y otros rizobios (incluyendo *Rhizobium meliloti*), pero trabajos posteriores han demostrado que *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium fredii* son bastante similares (Jarvis, Downer y Young, 1992), y las nuevas definiciones de *Sinorhizobium* los incluyen a ambos, así como a dos nuevas especies, *Sinorhizobium teranga* y *Sinorhizobium saheli*.

-género *Mesorhizobium*

Se ha reconocido desde hace mucho tiempo que *Rhizobium loti* es bastante distinto de las otras especies de crecimiento rápido, tales como *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium meliloti*, lo cual es evidente por su secuencia de ARNr 16s; hay algunas especies cercanas en la secuencia del ARNr 16s a *Rhizobium loti*, conocidas como *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium tianshanense* y *Rhizobium mediterraneum*. Está extendido el acuerdo de que este grupo merece ser reconocido como un nuevo género, pero aún no se han publicado propuestas formales. Los taxonomistas sugirieron el nombre de "*Mesorhizobium*" aludiendo a la lenta velocidad de crecimiento, intermedia entre las típicas tasas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Este nombre no ha sido seriamente reconocido aún.

-un cuarto género para los rizobios de crecimiento rápido.

La secuencia de ARN 16s de *Rhizobium galegae* no encaja en ninguno de los grupos genéricos nombrados. Es el más cercano a las secuencias de algunas especies de *Agrobacterium*, pero no lo suficiente como para ser transferido a dicho género. Por el momento, esta es la única especie rizobia de esta rama, y es preciso identificar otras especies relacionadas antes de transferirlo a un género diferente; de momento se ha encajado como *Rhizobium*.

Limitaciones de la secuenciación de ARNr 16s como herramienta taxonómica y filogenética.

En general, los resultados obtenidos con esta técnica son correctos (Olsen, Woese y Overbeek, 1994), pero este método tiene sus limitaciones. La secuenciación es muy útil para asignar especies a géneros o para definir relaciones entre géneros, pero generalmente no es efectiva cuando se trata de especies cercanas.

-recombinación entre secuencias de ARNr 16s.

Usualmente se asume que los genes que codifican el ARNr 16s no son transferidos entre especies, y que su evolución en los distintos linajes es independiente. Esto es una condición necesaria para construir filogenias válidas. Sin embargo, Sneath (1993) presentó un análisis detallado de una serie de secuencias que mostraron claras evidencias de recombinación entre los genes que codifican el ARNr 16s de distintos linajes del género *Aeromonas*, y fenómenos similares aparecen entre los rizobios.

-recombinación entre los genes que codifican el ARN 16s y otros genes distintos.

Hay un número sustancial de diferencias entre las secuencias de las estirpes tipo de *Rhizobium leguminosarum* y la de *Rhizobium etli*. Early y col. (1995) utilizaron enzimas de restricción para diferenciar estas dos estirpes tipo, en una gran muestra de rizobios de judía, que también fueron caracterizados mediante la electroforesis de otros genes cromosómicos. Encontraron que algunas estirpes que tenían una enzima tipo que las agrupaba con *Rhizobium etli* tenían su patrón de secuenciación de ARNr 16s como *Rhizobium leguminosarum*, y viceversa. Por esto, diferencias en estas secuencias no necesariamente indican una divergencia en el genoma.

-identidad entre especies.

El ARNr 16s es una molécula bastante conservada, y no puede ser usada para la discriminación de especies cercanas, ya que el número de secuencias idénticas entre dichas especies suele ser bastante alto.

-heterogeneidad en especies.

En un principio las filogenias basadas en el ARNr 16s estuvieron basadas en su mayoría en las estirpes tipo de cada especie. Conforme se acumulan datos sobre secuencias, se detectan diferencias que no superan el 1% entre estirpes de la misma especie, pero diferencias de igual magnitud son detectadas entre especies muy cercanas.

-heterogeneidad en los genomas.

Aunque la mayoría de las bacterias tienen varias copias de los genes que

codifican el ARNr 16s, y estas copias tienen idénticas secuencias entre sí, ocasionalmente pueden encontrarse variaciones en las secuencias del ARNr 16s dentro de un único aislado .

-fenotipos bacterianos, familias y filogenia.

Los rizobios han sido clasificados durante años junto con las agrobacterias y las filobacterias en la familia Rhizobiaceae, aunque está claro que esta familia, definida por la interacción de estas bacterias con las plantas, no es natural. Las comparaciones entre las secuencias de ADN indican que cada uno de los géneros de rizobios reconocidos tiene una cercanía relativa hacia familias tales como Rhodospirillaceae (que es fotosintética) y Rickettsiaceae (patógena). Todos estos organismos pertenecen al subgrupo alfa de las Proteobacterias, pero las familias tradicionales basadas en propiedades fenotípicas no están bien correlacionadas con las relaciones evolutivas indicadas por las evidencias moleculares. Propiedades como la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno se han perdido, repetido o transferido entre linajes.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El cultivo de la soja es de gran importancia para Brasil, no solo por la obtención de divisas relacionadas con la exportación de semillas y derivados industriales, sino también por el papel creciente que la soja viene ocupando como suplementación proteica del brasileño.

Con una productividad media nacional de 2200 kilos por hectárea, la soja acumula cerca de 180 kilos de nitrógeno por hectárea; aproximadamente el 70%, son localizados en las semillas, siendo retirados de la zona con la recolección.

En ausencia del proceso biológico, serían necesarios para conseguir estos niveles de productividad cerca de 300 kilos de nitrógeno por hectárea en forma de fertilizantes nitrogenados, lo cual supone un coste prohibitivo para el agricultor.

Entre tanto, con el incremento de los niveles de productividad de la soja en el país, y con el establecimiento de una población de estirpes de rizobio que no es la más eficiente de que se dispone hoy, pero que fue introducida con las primeras inoculaciones, se vuelve necesario conducir nuevas líneas de investigación, buscando la mantención, y, principalmente, la elevación de los niveles de nitrógeno de las plantas mediante la fijación biológica.

Utilizándose datos calculados por el sector EMBRAPA-Soja, con un área recolectada de 11.350.000 hectáreas en la cosecha de 1993/94, y con una productividad media de 2156 kilos por hectárea, y considerándose que la recomendación actual para ese cultivo es el uso de inoculación sin suplementación de cualquier fuente de fertilizante nitrogenado, se calcula que el país economiza, hoy, mil millones de dólares con la inoculación de la soja.

Consecuentemente es necesario desarrollar investigaciones basadas y aplicadas tanto en el microsimbionte como en la planta hospedadora.

EL OBJETIVO PRINCIPAL de este trabajo consiste en:

- 1) Estudiar la biodiversidad de sinorrizobios de diferentes orígenes de Brasil.
- 2) Clasificar los aislados en base a sus características morfológicas, fisiológicas y moleculares.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Manipulaciones bacterianas

1. Bacterias utilizadas
2. Medios, condiciones de cultivo y conservación de las cepas
3. Congelación de cepas
4. Antimicrobianos y productos químicos añadidos a los medios de cultivo

B. Ensayos y procedimientos realizados

1. Aislamiento de variedades de microorganismos de crecimiento rápido aislados de nódulos de soja obtenidos de suelos brasileños
 - 1.1. Estudio de la morfología de las colonias
 - 1.2. Estudio del tiempo de replicación
 - 1.3. Estudio de la acidificación del medio YM
 - 1.4. Estudio de la tolerancia a la acidez y la alcalinidad
 - 1.5. Tolerancia a la salinidad y a temperaturas altas
 - 1.6. Estudio del crecimiento en LB y síntesis de melanina
 - 1.7. Estudio de la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno
 - 1.8. Estudio de la resistencia intrínseca a antibióticos y metales pesados
 - 1.9. Análisis genéticos con los cebadores específicos ERIC y REP utilizando la técnica de PCR
 2. Grupos de análisis para la realización de la taxonomía numérica
 3. Extracción y purificación de ADN total
 4. Electroforesis en geles de agarosa
-

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Manipulaciones bacterianas

1. Bacterias utilizadas.

Las cepas de rizobios utilizadas en los diferentes experimentos se muestran en la Tabla 3.

2. Medios, condiciones de cultivo y conservación de las estirpes.

2.1. Medio de TY (Beringer, 1974).

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml de CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

Tabla 3. -Estirpes de bacterias utilizadas

<u>Estirpe</u>	<u>Otras denominaciones</u>	<u>Fuente o referencia</u>
<i>Sinorhizobium fredii</i>		
CCBAU	TR15	E. T. Wang
USDA205	ATCC35423, LMG6217, PRC205	P. van Berkum
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
USDA1002	ATCC9930, LMG6133, 3DOa2	P. van Berkum
<i>Sinorhizobium saheli</i>		
ORS609	USDA4893	P. van Berkum
<i>Sinorhizobium teranga</i>		
ORS1009	USDA4894	P. van Berkum
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>		
USDA2145	ATCC14480, LMG8820, 3DIK22a	P. van Berkum
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>		
USDA2671	RCR3644	P. van Berkum
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
USDA6	ATCC10324, 311b6, RCR3425	P. van Berkum
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		
USDA94		P. van Berkum
<i>Bradyrhizobium</i> spp. (<i>Aeschynomene indica</i>)		
BTAiL	USDA4362	P. van Berkum
<i>Mesorhizobium huakuii</i>		
CCBAU2609	USDA4779	P. van Berkum
<i>Mesorhizobium loti</i>		
NZP2213	ATCC33669, LMG6125, USDA3471	P. van Berkum
<i>Azorhizobium caulonodans</i>		
ORS571	USDA4892	P. van Berkum
<i>Rhizobium tropici</i>		
IIACFN299	USDA9039, LMG9517	E. Martínez

2.2. Medio de LB (Luria-Bertani) (Maniatis y col., 1982).

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los soluto se hayan disuelto. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.3. Medio de YM (Somaseragan y Hoben , 1994).

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.4. Medio de TY tamponado (pH=8,9) (Costilow, 1981).

Trizma [®] base 0,05M	500 ml
ClH 0,1M	70 ml
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el pH a 8,9 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

2.5. Medio de TY tamponado (pH=4,0) (Costilow, 1981).

Acido cítrico 0.1M	300 ml
Na ₂ HPO ₄ 0.2M	192 ml
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disueltos. Ajustar el pH a 4,0 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml de CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

2.6. Medio de YM a una concentración de 0,5M en ClNa.

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	29,2 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.7. Medio de YM con una concentración de 0,3M en NaCl.

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	17,6 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.8. Medio de YM con una concentración de 0,1M en CINa.

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	5,84 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

2.9. Medio de TY a una concentración de 0,5M en CINa.

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	29,2 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml de CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

2.10. Medio de TY a una concentración de 0,3M en CINa.

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	17,6 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml de CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

2.11. Medio de TY a una concentración de 0,1M en ClNa.

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
NaCl	5,84 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

2.12. Medio de TY especial para el estudio de la producción de melanina.

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Tirosina	1,2 g
CuSO ₄	40 mg
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Añadir 9 ml de CaCl₂ 1M estéril por litro de medio.

2.13. Medio definido de Brown y Dilwoth (Bergersen, 1980).

KH ₂ PO ₄	0,36 g
K ₂ HPO ₄	1,40 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g
NaCl	0,20 g
Azul de bromotimol al 0,5%	5 ml
Concentrado de micronutrientes	1 ml
NH ₄ Cl	0,70 g
Agua destilada	c.s.p. 1 l

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 6,8 usando una solución de ClH (35%) o NaOH (2M). Repartir en matraces (120 ml c.u.) y añadir agar a una concentración del 1,5%. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Dejar enfriar hasta temperatura de sobrefusión y añadir el sustrato que se vaya a estudiar (fuente de carbono a las concentraciones que se indican posteriormente) y 0,5 ml de una "solución de vitaminas" (ver apartado 2.14).

Si la adición del sustrato en estudio, acidifica o alcaliniza el medio, cambiará el color verde del azul de bromotímol a amarillo (medio ácido) o azul (medio básico), y entonces será necesario corregir el pH del medio añadiendo ClH (35%), o NaOH (2M) estéril.

Si el sustrato a estudiar fuesen las diferentes fuentes de nitrógeno, se utilizará el mismo medio, pero sustituyendo el NH₄Cl por glucosa (2,5 g/l).

Cuando se procedió a estudiar si los aminoácidos se utilizaron como fuentes de carbono y nitrógeno, el medio no fue adicionado ni con glucosa ni con NH₄Cl.

Si el sustrato en estudio es un metal pesado, el medio irá provisto de glucosa y NH₄Cl.

Tanto los azúcares como los aminoácidos y metales pesados ensayados fueron previamente disueltos en agua, y esterilizados por filtración con membrana de nitrato de celulosa de 0.22 μm de diámetro de poro.

Las soluciones stocks u originales de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno se prepararon como se indica a continuación:

azúcares	375 mg/1,5 ml H ₂ O destilada
aminoácidos	75 mg/1,5 ml H ₂ O destilada

La concentración final de las fuentes de carbono en placa fue de 3,125 mg/ml de medio (0.31%), y de las fuentes de nitrógeno fue de 0,625 mg/ml de medio (0,06%).

2.14. Solución de vitaminas.

Tiamina	100 mg
Pantotenato cálcico	200 mg
Biotina	0,1 mg
Agua destilada	c. s p. 1 l

Agitar hasta que los solutos se hayan disuelto. Esterilizar por filtración con membrana

de nitrato de celulosa de 0.22μ de diámetro de poro. Guardar a 4°C y protegido de la luz.

2.15. Solución de micronutrientes.

FeCl_3	6,60 mg
EDTA	0,15 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,16 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 mg
BO_3H_3	0,25 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,20 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mg
Agua destilada	c.s.p. 1 l

La solución se prepara a una concentración 50x. Agitar hasta que los solutos se hayan disueltos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Guardar a 4°C .

2.16. Medios sólidos.

Para trabajar con medios sólidos, se preparará medio líquido de acuerdo con las recetas dadas anteriormente, y antes de autoclavar se añade agar a una concentración de 15 a 20 g/l, según tipo de agar utilizado.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. y verter en placas cuando el medio esté a la temperatura de sobrefusión, agitando suavemente para conseguir una buena distribución del agar en el medio.

Si se debe añadir alguna solución termosensible, hacerlo justamente cuando el medio alcance la temperatura de sobrefusión.

Las placas deberían sacarse de la cámara de 4°C de 1 a 2 horas antes de ser usadas. Si las placas están frías, se humedecerán al ser incubadas a 37°C , lo que permitirá a las colonias bacterianas extenderse a través de la superficie de la placa, aumentando el riesgo de contaminación cruzada. Este problema puede evitarse limpiando cualquier condensación de las tapaderas de las placas, y entonces incubando las placas durante varias horas a 37°C , antes de usarlas, en posición invertida. Alternativamente, el líquido puede quitarse por agitación de la tapadera en un único y

enérgico movimiento. Para minimizar la posibilidad de contaminación, mantener la placa abierta en posición invertida mientras se elimina el líquido de la tapa. (Maniatis y col., 1982).

3. Congelación de cepas.

Para congelar cepas crecidas en medio líquido, se añaden a 900 μ l de cultivo bacteriano 100 μ l de glicerol estéril. Agitar el cultivo para asegurar que el glicerol está convenientemente mezclado. Transferir el cultivo a un tubo etiquetado provisto de tapón de rosca y junta hermética, y almacenar.

Congelar el cultivo en una solución de etanol, hielo seco, o nitrógeno, y luego poner el tubo a -80°C , para su conservación.

Para recuperar la bacteria, tomar un inóculo de la superficie del cultivo con un asa de platino estéril, e inmediatamente hacer una siembra en estrías en medio sólido adecuado. Volver a guardar el congelado a -80°C (Maniatis y col., 1982).

Para congelar bacterias crecidas en medio sólido, recoger las bacterias crecidas sobre la superficie de la placa de agar y ponerlas en un tubo estéril con 2 ml de medio líquido; añadir un volumen igual de glicerol al 30%. Agitar la mezcla para asegurar que el glicerol esté completamente mezclado. Repartirlo en tubos con tapón de rosca y junta hermética. Congelar a -80°C como se indica en el párrafo anterior.

4. Antimicrobianos y productos químicos añadidos a los medios de cultivo.

4.1. Antibióticos.

Antimicrobianos	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Concentraciones de la solución usada
cloranfenicol	10	34 mg/ml en etanol
	20	
	40	
eritromicina	50	50 mg/ml en H ₂ O dest.
	75	
	100	
sulfato de gentamicina	10	25 mg/ml en H ₂ O dest.
	20	
	40	
kanamicina	10	50 mg/ml en H ₂ O dest.
	20	
rifampicina	5	15 mg/ml en metanol
	10	
	20	
sulfato de estreptomicina	50	200 mg/ml en H ₂ O dest.
	75	
	100	
tetraciclina	10	20 mg/ml en etanol al 50%
	20	
	40	

Los antimicrobianos preparados en agua destilada, fueron esterilizados por filtración en membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,22 μm . Todas las soluciones de reserva se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.2. Metales pesados.

Se utilizaron los siguientes metales pesados a las concentraciones indicadas:

<u>Metales pesados</u>	<u>Concentración final (mM)</u>
cloruro de cadmio	0,5
	1,0
	2,0
cloruro de cobalto	0,5
	1,0
	2,0
cromato potásico	0,25
	0,5
	1,0
sulfato de níquel	0,5
	1,0
	2,0
acetato de plomo	2,5
	5,0
	10,0
	20,0
sulfuro de selenio	5,0
	10,0
	20,0

Los metales pesados fueron esterilizados por filtración en membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Las soluciones fueron conservadas a 4°C hasta su utilización.

4.3. Indicadores.

El azul de bromotimol (3', 3''-dibromotimolsulfonftaleína) fue utilizado para detectar cambios en el pH del medio, los cuales fueron corregidos con ClH (35%) o NaOH (2M) estéril. Este indicador tiene un intervalo de viraje de pH de 5,8 a 7,6, siendo de color azul si el pH es básico, verde a pH neutro, y amarillo si el medio es

ácido. Se prepara a una concentración del 5%, añadiéndose 5 ml de dicha solución por cada litro de medio.

El rojo congo es un indicador de absorción, azul a pH=3, rojo a pH=5,2, que se utilizó para detectar posibles contaminaciones, ya que las bacterias en estudio no lo fijan, careciendo por tanto las colonias de este color. Se usó a una concentración de 0,0025g/l.

El bromuro de etidio (2,7-diamino-10-etil-9-fenil-bromuro fenantridínico) es un colorante fluorescente para la observación de ácidos nucleicos usando electroforesis en gel de agarosa.

4.4. Fuentes de carbono.

Se utilizaron los siguientes sustratos como fuentes de carbono:

caseína	D-lactosa
D-celobiosa	malato
citrato	maltosa
dulcitol	D-manitol
D(+) fucosa	D(+) manosa
D(-) fructosa	mioinositol
D(+) galactosa	piruvato
gluconato	D(+) rafinosa
D(+) glucosa	α -ramnosa
D(+) glucosamina	D(-) ribosa
L(-) glutámico	D-sorbitol
L-glutámico	succinato
glicerol	sacarosa

Todas las sustancias se solubilizan perfectamente en agua, salvo la caseína, para la cual se utilizará una solución de álcalis diluido.

4.5. Fuentes de nitrógeno.

<u>Fuentes de nitrógeno</u>	<u>características de solubilidad</u>
adenina	difícil solubilidad en agua soluble en hipoclorito sódico soluble en ácidos minerales
L-alanina	soluble en agua. soluble en ácidos minerales insoluble en disolventes orgánicos
alantoína	
L-arginina	soluble en agua
L-asparagina	soluble en agua
L-cisteína	soluble en agua
L-cistina	soluble en agua
citosina	soluble en ácidos minerales soluble en agua alcalina soluble en agua caliente insoluble en disolventes orgánicos
L-fenilalanina	soluble en ácidos minerales insoluble en disolventes orgánicos
L-glutamina	soluble en agua
glicina	soluble en agua
guanina	soluble en lejía difícil solubilidad en agua caliente insoluble en disolventes orgánicos soluble en ácidos minerales
L-histidina	soluble en agua soluble en ácidos minerales insoluble disolventes orgánicos
L isoleucina	soluble en agua soluble en ácidos minerales insoluble en disolventes orgánicos
L-leucina	soluble en agua caliente soluble en ácidos minerales insoluble en etanol y éter
L-lisina	soluble en agua soluble en ácidos minerales

<u>Fuentes de nitrógeno</u>	<u>características de solubilidad</u>
L-metionina	poco soluble en agua
L-prolina	soluble en agua
L-serina	soluble en agua
	soluble en ácidos minerales
	insoluble en disolventes orgánicos
L-treonina	soluble en agua
	soluble en ácidos minerales
	insoluble en disolventes orgánicos
timina	soluble en ácidos minerales
	soluble en álcalis
	difícil solubilidad en agua
L-triptófano	soluble en agua
L-tirosina	soluble en agua
uracilo	soluble en ácidos minerales
	soluble en álcalis
	difícil solubilidad en agua
D-valina	soluble en agua
	soluble en ácidos minerales
	insoluble en disolventes orgánicos

4.6. Fuentes de carbono y nitrógeno.

Como fuentes únicas de carbono y nitrógeno se utilizaron las que se relacionan a continuación:

alantoína	L-histidina	L-serina
L-arginina	L-metionina	L-triptófano
L-cisteína	L-fenilalanina	L-valina
L-glutamina	L-prolina	

Las características de solubilidad han sido descritas en el apartado anterior.

B. Ensayos y procedimientos realizados

1. Aislamiento de microorganismos de crecimiento rápido a partir de nódulos de soja obtenidos de suelos brasileños.

Las localizaciones de los 22 campos usados en este estudio se muestran en las Figuras 4 y 5.

Los sitios incluyen zonas inalteradas cubiertas con vegetación nativa y campos tradicionalmente cultivados con soja, como se describe en la Tabla 4.

Las muestras de suelo fueron recogidas a la profundidad de 0 a 20 cm, según métodos estandarizados (Andrade y Hahakawa, 1994) y las características químicas se muestran en la Tabla 5.

Como plantas trampa se utilizaron las semillas de los siguientes genotipos de soja:

pickett 71	PI88788
peking	PI90763
PI 245331	BR-16
PI 437654	

Todos los genotipos son capaces de nodular con *S. fredii* (Chueire y Hungría, 1997), y todas, excepto la última, que es un cultivo moderno (mejorado), son genotipos no cultivados (que no se utilizaron para la siembra).

Las semillas suministradas por el banco de germoplasma de Embrapa-Soja fueron esterilizadas (Andrade y Hamakawa, 1994) y pregerminadas durante dos días.

Cada planta del semillero fue inoculada con 500 μ l de suelo diluido (10 g de suelo mezclado con 95 ml de NaCl al 0.85%, agitado en tarros de cristal durante 30 min.), por triplicado, y se permitió que crecieran en tarros de cristal conteniendo un papel de filtro y una solución nutritiva estéril para plantas, libre de nitrógeno (Andrade y Hamakawa, 1994).



Figura 3: Mapa de América del Sur

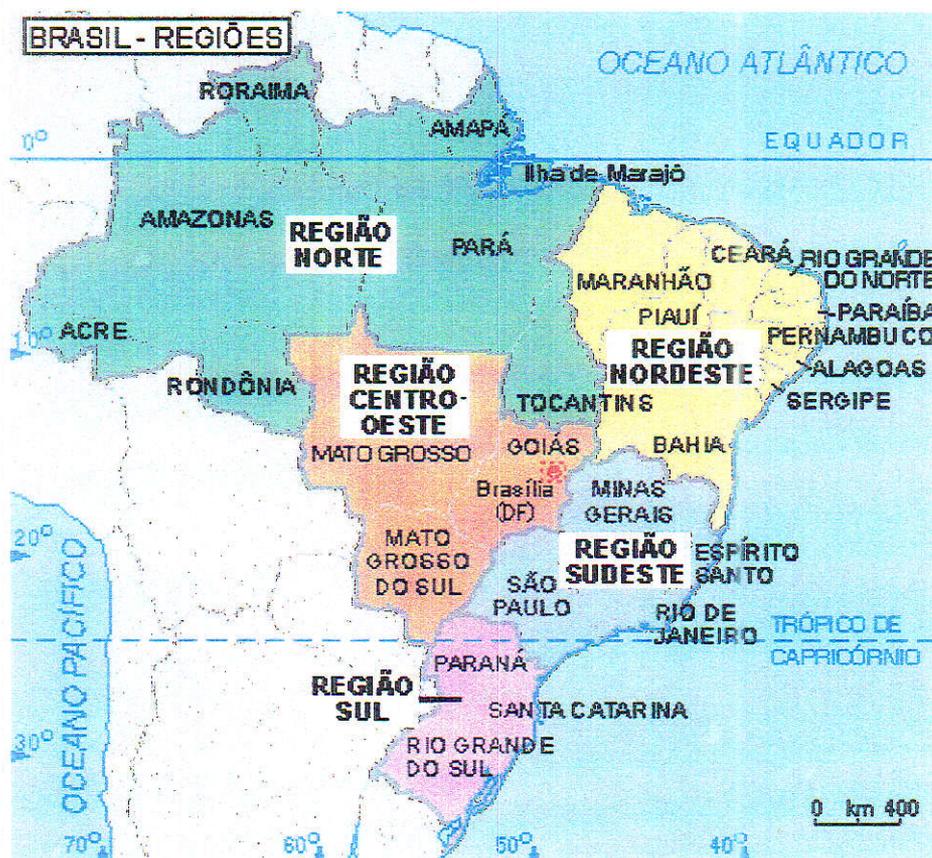


Figura 4: Localização de los campos situados en cinco estados brasileiros y en el Distrito Federal



Figura 5: Regiones del Estado de Paraná

TABLA 4. Localización y tipos de cultivo en los suelos utilizados para el aislamiento de sinorrizobios.

Suelo	Región	Estado	Tipo de suelo
1	Ponta Grossa	Paraná (PR)	Cultivo convencional y soja como cultivo de verano durante mas de cinco años.
2	Ponta Grossa	PR	Previamente cultivado con soja, pero ahora cultivado con judías (<i>Phaseolus vulgaris</i>) bajo métodos no tradicionales durante los últimos tres años.
3	Ponta Grossa	PR	Suelos inalterados con bosques subtropicales nativos.
4	Castro	PR	Sistema no convencional y soja como cultivo de verano durante más de cinco años.
5	Castro	PR	igual que el suelo 1.
6	Londrina	PR	igual que el suelo 4.
7	Londrina	PR	igual que el suelo 1.
8	Passo Fundo	Rio Grande do Sul (RS)	Suelo inalterado cubierto con boques subtropicales nativos.
9	Passo Fundo	RS	Suelos inalterados cubiertos con hierbas nativas.
10	Planaltina	Distrito Federal (DF)	Suelos inalterados cubiertos con vegetación de Cerrado (un tipo de suelo de sabana).
11	Planaltina	DF	Suelos inalterados cubiertos con vegetación de Cerrado (mayor densidad de árboles que el Cerrado).
12	Planaltina	DF	Igual que el suelo 10.
13	Manaus	Amazonas (AM)	Suelos inalterados cubiertos con bosques tropicales nativos.
14	Manaus	AM	Igual que el suelo 13.
15	Campinarama	AM	Igual que el suelo 13.
16	Campinarama	AM	Igual que el suelo 13.
17	Itutinga	Minas Gerais (MG)	Suelos inalterados cubiertos con vegetación nativa.
18	Itutinga	MG	Igual que el suelo 17.
19	Lavras	MG	Igual que el suelo 17
20	Goiânia	Goiás (GO)	Igual que el suelo 10.
21	Goiânia	GO	Igual que el suelo 10.
22	Londrina	PR	Igual que el suelo 4.

TABLA 5. Propiedades químicas de los suelos

Suelo	pH en CaCl ₂	N (%)	Al	K	Ca	Mg	H+Al	Al ^a	BS ^b %	C (%)	P (mg dm ⁻³)	
			————— (cmol _c dm ⁻³) —————									
1	4,52	0,10	0,30	0,30	5,29	2,43	6,29	3,60	56,04	2,24	7,0	
2	4,60	0,12	0,08	0,28	2,37	1,65	6,39	1,83	40,22	1,22	3,6	
3	4,47	0,26	0,23	0,20	1,81	1,35	6,78	6,40	56,04	2,75	20,3	
4	5,09	0,15	0,00	0,38	3,39	1,72	4,50	0,00	54,95	3,45	14,4	
5	4,92	0,15	0,00	0,25	8,39	3,38	5,55	0,00	68,41	1,94	3,4	
6	4,70	0,15	0,01	0,32	4,09	1,50	5,03	0,17	54,02	2,46	7,5	
7	4,64	0,14	0,00	0,85	5,71	1,79	4,64	0,00	68,28	1,67	12,8	
8	4,15	0,54	0,55	0,50	7,05	2,17	11,0	5,35	46,91	4,87	23,9	
9	4,52	0,14	0,28	0,13	3,27	2,09	6,68	4,85	45,11	2,64	2,7	
10	4,00	0,13	0,87	0,08	0,07	0,08	7,99	79,09	2,80	1,95	0,6	
11	3,85	0,18	0,90	0,16	0,22	0,32	11,25	56,25	5,86	2,62	1,1	
12	3,87	0,16	0,88	0,08	0,02	0,08	8,35	83,01	2,11	2,42	0,6	
13	3,61	0,69	1,18	0,05	0,00	0,04	6,25	92,91	1,42	1,29	2,0	
14	3,58	0,07	1,34	0,03	0,00	0,04	6,11	95,03	1,13	1,40	1,1	
15	3,93	0,08	0,88	0,02	0,00	0,00	4,71	97,77	0,42	0,69	0,6	
16	3,04	0,04	1,53	0,01	0,02	0,00	6,44	98,07	0,46	0,73	1,3	
17	4,55	0,37	0,15	0,33	4,37	1,60	6,68	2,32	48,54	4,40	2,1	
18	4,32	0,18	0,28	0,16	0,05	0,00	6,88	57,14	2,96	2,59	0,8	
19	3,72	0,27	0,95	0,17	0,05	0,00	10,29	81,19	2,09	3,05	1,7	
20	4,07	0,13	0,41	0,11	0,32	0,28	5,67	36,60	11,13	1,46	0,6	
21	4,36	0,26	0,22	0,28	2,32	1,06	6,63	5,67	35,57	2,74	0,9	
22	4,75	0,18	0,08	0,60	4,74	2,05	6,22	1,08	54,30	1,52	30,3	

^a Al (%) = (Al / Al + K + Ca + Mg).100.

^b Saturación base = [K + Ca + Mg / T_{ccc}].100, donde T_{ccc} = K + Ca + Mg + acidez total a pH 7,0 (H + Al).

Después de cuatro semanas, todos los nódulos fueron recogidos y se aislaron las estirpes de rizobios utilizando métodos microbiológicos estándares (Somasegaran y Hoben, 1994). Se aseguró la pureza de los cultivos mediante siembras en estrías repetitivas de la bacteria en medio YM analizándose la morfología única de las colonias, absorción de rojo congo, y el comportamiento frente a la tinción de Gram.

Las bacterias, mostrando un crecimiento rápido (crecen tras dos o tres días después de la inoculación) y una reacción ácida en medio YM conteniendo 25 $\mu\text{g/ml}$ de azul de bromotimol, fueron reinoculadas en cultivos de soja del genotipo BR-16 y en los genotipos de los huéspedes no cultivados, para confirmar que nodulan en soja y que lo hacen eficazmente. Las estirpes aisladas de los nódulos de BR-16 fueron reinoculadas en el genotipo Peking. Las bacterias seleccionadas se mantuvieron en cultivos congelados, y en placas a 4°C para su uso rutinario.

1.1. Estudio de la morfología de las colonias.

Para la evaluación de éste y otros parámetros, se preparó un inóculo en medio YM, con pH inicial ajustado a 6,8 y se permitió el crecimiento durante cuatro días, a 28°C, con oscuridad y agitación (190 r.p.m.). La morfología de las colonias (color, mucosidad, transparencia, diámetro, forma, bordes, elevación) fue evaluada mediante una siembra en estrías del inóculo inicial en medio YMA, incubando en la oscuridad a 28°C durante 3, 5 y 7 días.

1.2. Estudio del tiempo de replicación.

100 μl del inóculo inicial fueron transferidos a tubos conteniendo 5 ml de medio YM o medio TY por triplicado.

Se dejaron crecer las bacterias a 28°C, con agitación (190 r.p.m.), en la oscuridad, durante siete días. El crecimiento fue evaluado mediante la lectura de la densidad óptica en espectrofotómetro (Milton Roy Company, Spectronic 20 D), a una longitud de onda de 600 nm, para lo cual se utilizaron valores de absorbancias. El número de células viables fue comprobado mediante la siembra de alícuotas de 100 μl

de diluciones seriadas (diluciones desde 0,1 a 0,0001) en placas conteniendo medio YMA o TYA. Las diluciones se hicieron de la siguiente forma: 100 μ l del inóculo inicial fueron mezclados con 900 μ l de solución salina, obteniéndose así la primera dilución (0.1); para la segunda dilución se tomaron 100 μ l de la primera y se adicionaron con 900 μ l de solución salina; las demás diluciones se hicieron de forma análoga.

1.3. Estudio de la acidificación del medio YM.

100 μ l del inóculo inicial fueron transferidos a tubos conteniendo 5 ml de medio YM con un pH inicial ajustado a 7,0. El pH final fue medido con ayuda del pHmetro (micropH 2001 de Crison), tras cuatro días de crecimiento en oscuridad a 28°C.

Igualmente, 100 μ l del inóculo inicial fueron extendidos en placas de medio YMA, que contenían 25 μ g/ml de azul de bromotimol y pH inicial de 7,0. La reacción ácida fue verificada de acuerdo al color amarillo producido.

1.4. Estudio de la tolerancia a la acidez y alcalinidad.

Para la tolerancia a la acidez y/o alcalinidad se realizó el estudio mediante dos procedimientos diferentes:

- a) 100 μ l del inóculo inicial fueron transferidos a tubos con 5 ml de medio TY, y tubos con 5 ml de YM, con el pH previamente ajustado a 4,0; 5,0; 6,5 y 9,5. Los cultivos se mantuvieron con agitación (190 r.p.m.) a 28°C durante 7 días.
- b) 100 μ l del inóculo inicial fueron transferidos a tubos con 5 ml de medio TY tamponado a pH 4,0 o 8,9, incubándose a 28°C, con agitación (190 r.p.m.) durante 7 días.

Se realizó una medida del pH final del cultivo después de los siete días de

incubación.

Los controles se realizaron sembrando las bacterias en medio TY, a pH 6,8, e incubando en las condiciones citadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

1.5. Tolerancia a la salinidad y a temperaturas altas.

La tolerancia a la salinidad fue verificada en tubos con 5 ml de medio TY y en tubos con 5 ml de medio YM, estando el pH inicialmente ajustado a 6,8, y concentraciones finales de NaCl de 0,1M, 0,3M y 0,5M. Como control se utilizó el crecimiento de las bacterias en medio YM o medio TY a pH 6,8. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para estudiar la tolerancia a temperaturas altas se realizó una siembra en estrías de cada estirpe, por triplicado, en placas de medio TYA e YMA, y se dejaron crecer a 28°C (control), 37°C y 40°C durante siete días.

1.6. Estudio del crecimiento en LB y síntesis de melanina.

Al ensayar el crecimiento en LB, se utilizó dicho medio para la siembra en estrías de cada estirpe. La siembra se realizó por triplicado, y la incubación fue realizada a 28°C durante siete días.

La síntesis de melanina fue evaluada según el método de Rodríguez-Navarro y col., (1996), sembrando por triplicado en placas de medio TYA para melanina con el pH ajustado a 6,8. Se añadió un suplemento de tirosina ya que ésta induce la síntesis de melanina.

Tras cinco días de incubación a 28°C, se leyeron los resultados, y las placas fueron entonces lisadas tal como describe Cubo y col., (1988).

1.7. Estudio de la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.

Para estos ensayos fue utilizado el medio definido de Brown y Dilworth, con pH ajustado a 6,8. El azul de bromotimol permitió detectar reacciones ácidas o básicas debidas al metabolismo de la bacteria.

Se añadieron 500 μ l del inóculo inicial a cada pocillo de una placa microtiter, y se procedió a la inoculación con un replicador.

Como controles se usaron tres medios : YMA, TYA y medio definido provisto de 10 g/l de manitol y 0,7 g/l de cloruro amónico.

El crecimiento fue leído tras 5 y 7 días de incubación en oscuridad a 28°C.

1.8. Estudio de la resistencia intrínseca a antibióticos y metales pesados.

La resistecia intrínseca a los antibióticos fue evaluada en medio YM, con pH 6,8 y los antibióticos nombrados en la sección correspondiente, los cuales fueron añadidos al medio YM esterilizado.

Las placas contenían 20 ml de medio, y la inoculación y condiciones de crecimiento se describieron en el apartado 8 de métodos.

El control consistió en la inoculación de la bacteria en el medio sin antibióticos, siendo considerada una estirpe como tolerante cuando el crecimiento fue al menos del 50% con respecto al control.

La resistencia intrínseca a los metales pesados fue evaluada utilizando el medio definido de Brown y Dilwoth; la inoculación, condiciones de crecimiento, controles para crecimiento positivo y evaluaciones, se hicieron como se describe anteriormente.

1.9. Análisis genético con los cebadores específicos ERIC y REP utilizando la técnica de PCR.

El ADN de las bacterias fue extraído de acuerdo con métodos microbiológicos estándares. Para la huella de ADN con cebadores ERIC y REP (a la concentración de 50 pm/ μ l) se siguió la metodología de de Bruijn (1992). Los cebadores utilizados fueron:

REP IR-1 [3' -CGGICTACIGCIGCIIII- 5']
 REP 2-1 [5' -ICGICTTATCIGGCCTAC- 3']
 ERIC IR [3' -CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA- 5']
 ERIC 2 [5' -AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG- 3']

Los ciclos se modificaron de acuerdo con el protocolo del laboratorio del Dr. de Bruijn, y el análisis fue realizado en un termociclador MJ Research Inc. 100.

Para REP 1R-1 y REP2-1, los ciclos fueron como sigue:

- * 1 ciclo a 95°C durante 6 min.
- * 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min. y 65°C durante 8 min.
- * 1 ciclo a 65°C durante 16 min.
- * varios minutos a 4°C

Para ERIC 1R y ERIC 2, los ciclos fueron como sigue:

- * 1 ciclo a 95°C durante 7 min.
- * 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 52°C durante 1 min. y 65°C durante 8 min.
- * 1 ciclo a 68°C durante 16 min.
- * varios minutos a 4°C

Después de la separación de los fragmentos amplificados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, la presencia o ausencia de bandas fue utilizada para el análisis de grupos utilizando el coeficiente Jaccard, como se describió en el apartado anterior.

2. Grupos de análisis para taxonomía numérica.

Para la primera matriz fenotípica, fueron considerados 19 parámetros:

1. Tipo de cultivo previo en el área de aislamiento.

no cultivada antes con soja (0)

cultivada (1)

2. Planta huésped

cultivo moderno (0)

genotipo no mejorado (1)

3. Color de la colonia

blanco (0)

crema o ligeramente crema (1)

4. Mucosidad de la colonia

baja (1 a 2) (0)

moderada y alta (3 a 5) (1)

5. Tipo de mucosidad de la colonia

suave (hasta 1) (0)

gomosa (2 a 3) (1)

6. Transparencia de la colonia

transparente o translúcida (0)

opaca (1)

7. Diámetro de las colonias

$\varnothing \leq 1.0$ mm (0)

$\varnothing > 1$ mm (1)

8. Tiempo de generación del cultivo

rápido (205-225 min.) (0)

más rápido (130-165 min.) (1)

muy rápido (85-115 min.) (1)

9. Crecimiento en medio TY e YM con pH=4,0

no (0)

si (1)

10. Crecimiento en medio TY e YM con pH=9,5
 - no (0)
 - si (1)
11. Crecimiento en medio YM tamponado con pH=4,0
 - no (0)
 - si (1)
12. Crecimiento en medio YM tamponado con pH=8,9
 - no (0)
 - si (1)
13. Acidificación de medio YM
 - pH final $\geq 6,1$ (0)
 - pH final $< 6,1$ (1)
14. Acidificación de medio YM
 - pH final $\geq 5,0$ (0)
 - pH final $< 5,0$ (1)
15. Acidificación de medio YMA
 - niveles 0 y 1 (0)
 - niveles 2 a 4 (1)
16. Tolerancia a la presencia de NaCl 0,5M
 - no (0)
 - si (1)
17. Crecimiento a 40°C
 - no (0)
 - si (1)
18. Crecimiento en medio LB
 - no (0)
 - si (1)
19. Síntesis de melanina
 - no (0)
 - si (1)

En relación con las fuentes de carbono y nitrógeno, sólo se consideraron aquellas a las que las cepas dieron diferentes usos. De las 26 fuentes de carbono probadas, 17 fueron consideradas como 1 si el crecimiento era mayor o igual a 0,5 (las fuentes no consideradas fueron: citrato, dulcitol, glucosamina, glucosa, glutámico, manitol, manosa, succinato y sacarosa).

Todas las fuentes de nitrógeno probadas (25), excepto la glicina, fueron consideradas como 1 cuando el crecimiento fue mayor que 1, y 0 cuando era menor o

igual que 1. Ninguno de los 11 componentes probados como fuentes de carbono y nitrógeno fue computado para los grupos de análisis. Por ello para la matriz de carbono y nitrógeno se consideraron 41 parámetros.

Para la matriz de antibióticos se consideraron tres niveles de concentración de siete antibióticos excepto para la kanamicina, que sólo se consideró una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Finalmente, para los metales pesados, los datos considerados fueron relativos a los tres niveles de concentración de metales pesados para cadmio, cobalto y selenio, y dos niveles para el cromo, obteniéndose un total de 11 parámetros.

Los dendogramas fueron construidos utilizando el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y el coeficiente Jaccard (J) con el programa de estadísticas NTSYS (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, version 1.80, Applied Biostatistics, New York).

3. Extracción y purificación de ADN total.

El ADN genómico total de las especies de *Rhizobium* se obtuvo por lisis con SDS/pronasa (Sigma), seguida de sucesivas purificaciones con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo, precipitación con etanol del 96% y lavado con etanol del 70%, tal y como se describe en Maniatis y col. (1982).

4. Electroforesis en geles de agarosa.

El ADN plasmídico, total o digerido fue analizado en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TBE 0,5x (Tris-base 90mM, Acido Bórico 90mM, Na₂-EDTA 2mM) y preparados a una concentración entre 0,8 y 1% de agarosa, tal como indican Maniatis y col. (1982), con la salvedad de que el bromuro de etidio se incorporó directamente al gel, a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Como tampón de carga se empleó azul de bromofenol al 0,15% en glicerol 50% y TBE 5x 5%.

Las bandas presentes en los geles se observaron en un transiluminador de luz

UV a una longitud de onda de 300 nm, fotografiándose con película Kodak TMAX 400 ASA y filtro Wratten N°23 A de la misma marca.

Los pesos moleculares de los fragmentos de restricción de ADN plasmídico se estimaron por interpolación de la recta log (peso molecular) frente a movilidad relativa de los fragmentos de ADN del fago lambda (Boehringer-Mannheim, Alemania) digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III (bandas de 23,13; 9,42; 6,56; 4,36; 2,32; 2,03 y 0,56 kb) o bien con las endonucleasas *Eco*RI y *Hind*III simultáneamente (bandas de 21,23; 5,15; 4,97; 4,27; 3,53; 2,03; 1,90; 1,58; 1,38; 0,95; 0,83 y 0,56 kb).

IV. RESULTADOS

-
1. Aislamiento de variedades de microorganismos de crecimiento rápido aislados de nódulos de soja obtenidos de suelos brasileños
 - 1.1. Morfología de las colonias
 - 1.2. Tiempo de generación de las diferentes estirpes
 - 1.3. Acidificación del medio YM
 - 1.4. Tolerancia a la acidez y alcalinidad
 - 1.5. Tolerancia a la salinidad y altas temperaturas
 - 1.6. Crecimiento en medio LB y síntesis de melanina
 - 1.7. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno
 - 1.8. Resistencia intrínseca a antibióticos y metales pesados
 - 1.9. Análisis genético con cebadores ERIC y REP mediante PCR
 2. Dendograma fenético final
-

IV. RESULTADOS

1. Aislamiento de microorganismos de crecimiento rápido a partir de nódulos de soja obtenidos de suelos brasileños.

Los suelos brasileños son muy ácidos, frecuentemente saturados con aluminio y con bajo contenido en nitrógeno y fósforo como muestra la Tabla 5. Se observó una alta saturación de aluminio (superior al 50%) en diez suelos, y un nivel mayor de nitrógeno en algunos suelos no labrados y cubiertos con vegetación nativa (por ejemplo los suelos 8 y 13). Los análisis de los suelos se llevaron a cabo en el laboratorio de suelo de EMBRAPA-Brasil.

La inoculación de seis genotipos de soja no mejorados, y uno mejorado, con las 22 muestras, permitió el aislamiento de 196 rizobios, siendo 30 de ellos caracterizados por crecimiento rápido y una reacción ácida en medio YMA (Tabla 6). Las cepas de crecimiento rápido se encontraron en 12 de los 22 suelos analizados, incluyendo zonas desde Amazonia a Río Grande do Sul. La mayoría de los aislados (63%) procedían de suelos cultivados, representando el 17% de la población inicial de rizobios.

Cuando se aisló de zonas inalteradas cubiertas con vegetación nativa, las cepas de crecimiento rápido representaron el 24% de la población (Tabla 6). La planta trampa huésped para cada aislado se muestra en la Tabla 7, siendo el 83% de las cepas atrapadas por genotipos no mejorados; consecuentemente, estos genotipos fueron tan efectivos como los cultivos mejorados para atrapar sinorrizobios. De todas formas, dentro de los genotipos primitivos, Pickett-71 y PI-437654 han atrapado 9 y 5 aislados respectivamente, y BR-16 atrapó 5 aislados, más que los otros cuatro genotipos primitivos usados en este estudio, incluyendo Peking (Tabla 7). La reinoculación confirmó que los 30 aislados fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno efectivos, tanto con genotipos modernos como con genotipos primitivos.

TABLA 6. Número de estirpes de rizobios de crecimiento lento y rápido aisladas de nódulos de seis genotipos de soja primitivos, y uno mejorado genéticamente, inoculados con 22 suelos brasileños.

Suelo^a	Rápido	Lento	Suelo^a	Rápido	Lento
1	7	12	12	0	5
2	1	7	13	0	5
3	2	6	14	0	0
4	3	8	15	3	12
5	1	19	16	0	0
6	2	17	17	0	7
7	0	18	18	0	0
8	3	2	19	0	0
9	1	8	20	0	2
10	1	0	21	0	0
11	1	6	22	5	32

^a Equivale a la misma numeración de los suelos de la Tabla 2.

TABLA 7. Suelos de origen y genotipo de la planta trampa utilizada para el aislamiento de las 30 estirpes de sinorrizobios empleados en este estudio.

Estirpe	Suelo^a	Genotipo de soja	Estirpe	Suelo^a	Genotipo de soja
1	1	PI90763	16	6	Pickett-71
2	1	Peking	17	8	PI437654
3	1	Peking	18	8	PI88788
4	1	Peking	19	8	BR-16
5	1	Pickett-71	20	9	PI437654
6	1	Pickett-71	21	10	BR-16
7	1	Pickett-71	22	11	PI90763
8	2	PI245331	23	15	PI437654
9	3	Pickett-71	24	15	PI437654
10	3	PI88788	25	15	PI90763
11	4	Peking	26	22	BR-16
12	4	Pickett-71	27	22	BR-16
13	4	Pickett-71	28	22	BR-16
14	5	PI437654	29	22	Pickett-71
15	6	PI88788	30	22	Pickett-71

^a Equivale a la misma numeración de suelos de la Tabla 2.

1.1. Morfología de las colonias.

Las diferencias entre las estirpes de rizobios se establecieron según los siguientes parámetros morfológicos:

- 1) El 73% de las estirpes de rizobios, presentaron en sus colonias una alta producción de mucosidad (nivel 3).
- 2) El 67% de las estirpes de rizobios tenían colonias pequeñas con un diámetro menor o igual a 1 mm.
- 3) El 73% de las estirpes de rizobios presentaron sus colonias de color blanco.
- 4) El 43% de las estirpes de rizobios presentan colonias opacas.

Todos estos datos se suman en la Tabla 8.

De todas formas no existe relación entre los datos morfológicos, el método de agricultura, o el lugar de aislamiento (Tabla 4), o con algunas de las características químicas del suelo (Tabla 5).

1.2. Tiempo de generación de las diferentes estirpes.

Las 30 estirpes estudiadas pueden considerarse de crecimiento rápido, ya que el tiempo de generación es menor a seis horas, pero pueden dividirse en tres grupos:

1. Velocidad de crecimiento lenta en medio YM: estirpes 8, 11 y 16. Tiempo de generación de 205 a 235 min.
2. Velocidad de crecimiento intermedia en medio YM: estirpes 26 a 30. Tiempo de generación de 130 a 165 min. Tienen forma pequeña (menos de 1 mm). Colonias blancas y opacas. Fueron aisladas de áreas tradicionalmente cultivadas con soja, del Estado de Paraná.
3. Velocidad de crecimiento muy rápida en medio YM: la presentan el 73% de las estirpes. Tiempo de generación de 85 a 115 min. Características morfológicas mixtas.

El tiempo de generación fue mayor en medio TY (dato no mostrado) que en el medio YM.

TABLA 8. Características morfológicas y tiempo de generación de los 30 estirpes de sinorizobios brasileños estudiados.

Estirpe	Color de la colonia	Mucosidad ^b		Transparencia de la colonia	Diámetro de la colonia (mm)	Tiempo de replicación (min)
		cantidad	tipo			
1	blanco	5	1	translúcida	2	95
2	blanco	5	1	translúcida	2	105
3	blanco	3	2	opaca	1	110
4	blanco	5	1	translúcida	1	115
5	blanco	5	2	transparente	2	90
6	cremoso	3	1	transparente	1	100
7	blanco	5	1	translúcida	2	105
8	blanco	3	3	opaca	<1	205
9	cremoso	2	2	opaca	<1	90
10	crema	2	2	opaca	1	95
11	blanco	2	3	opaca	<1	240
12	cremoso	5	1	translúcida	1	110
13	cremoso	3	1	transparente	1	85
14	blanco	5	1	translúcida	2	85
15	blanco	5	2	opaca	2	85
16	blanco	2	3	opaca	<1	225
17	crema	5	1	translúcida	1	85
18	blanca	4	1	translúcida	1	95
19	cremoso	4	1	translúcida	2	105
20	blanca	5	1	transparente	2	95
21	blanca	4	1	transparente	1	100
22	blanca	3	1	translúcida	<1	100
23	crema	3	2	translúcida	1	90
24	blanca	3	2	opaca	2	85
25	blanca	5	1	transparente	2	105
26	blanca	2	1	opaca	<1	165
27	blanca	2	1	opaca	<1	155
28	blanca	2	1	opaca	<1	170
29	blanca	2	3	opaca	<1	160
30	blanca	3	3	opaca	<1	130

^a Todas las estirpes muestran colonias con forma circular, margen liso y elevación convexa.

^b La escala considerada para el estudio de la mucosidad fue: cantidad de 1 (seco) a 5 (muy gomoso) y tipo de 1 (líquido y suave) a 3 (sólido y pegajoso).

1.3. Acidificación del medio YM.

Las cepas pudieron ser agrupadas en cuatro clases según la acidificación del medio YM con un pH inicial de 7,0:

1. Cuatro estirpes, todas aisladas de áreas previamente inoculadas y cultivadas con soja, acidificaron un poco el medio después de cuatro días de crecimiento, mostrando un pH final entre 6,7 y 6,9.
2. Siete estirpes, seis de áreas cultivadas, mostraron un rango de pH final desde 6,1 a 6,6.
3. Un grupo mayor, de 13 aislados de zonas cultivadas y zonas sin laboreo acidificaron el medio, con un pH final entre 5,0 y 6,1.
4. Seis estirpes, cinco aisladas de suelos sin laboreo, produjeron una reacción muy ácida, con un rango de pH final entre 3,7 y 4,4 (Tabla 9).

Las tres estirpes caracterizadas por un tiempo de generación más lento (8, 11 y 16) estuvieron dentro del grupo menos acidificante. De todas formas, para las otras variedades, la reacción ácida no estuvo relacionada con el tiempo de generación, mucosidad o con algún otro parámetro morfológico evaluado en este estudio.

En general, la reacción ácida en medio YMA fue similar a la obtenida en medio YM (Tabla 9), y las pequeñas diferencias pudieron ser atribuidas a las difusión del ácido en el agar.

En medio YM con rojo congo los acidificadores fuertes pudieron absorber el colorante después de varios días.

1.4. Tolerancia a la acidez y alcalinidad.

Todas las bacterias crecieron en medio TY e YM con pH 5,0 y 6,5 (dato no mostrado), pero se detectaron diferencias a pH 4,0 y 9,5, con respuestas parecidas en medio TY e YM (Tabla 9).

Aunque las bacterias han sido aisladas de suelos ácidos, algunos de ellos con pH de 4,0 o menos (estirpes 21, 22, 23, 24 y 25), el número de estirpes capaces de

TABLA 9. Tolerancia de las 30 estirpes de sinorrizobios brasileños a la acidez y alcalinidad en los medios TY, YM y TY tamponado. Valoraciones en el pH final tras cuatro días de incubación en los medios YM e YMA, con el pH inicialmente ajustado a 6,8.

Estirpe	Medios TY/YM		Medio TY tamponado		Reacción pH final en ácida en medio YM YMA	
	4,0	9,5	4,0	8,9		
1	^a	+	-	+	2 ^b	6,31
2	+	+	-	+	2	6,08
3	-	-	-	+	3	5,55
4	-	+	-	+	3	5,66
5	-	+	-	+	4	3,97
6	+	-	-	+	3	6,17
7	+	+	-	+	3	5,79
8	-	-	-	-	0	6,91
9	+	-	-	+	3	5,30
10	+	+	-	+	3	5,53
11	-	-	-	-	0	6,73
12	+	-	-	-	2	6,22
13	+	-	-	+	2	6,00
14	+	+	-	+	2	6,01
15	-	+	-	+	2	5,99
16	-	-	-	-	0	6,72
17	+	+	+	+	4	3,92
18	-	-	-	+	3	5,74
19	-	+	-	+	4	4,14
20	-	+	-	+	3	6,06
21	+	+	+	+	4	3,73
22	-	+	-	+	3	3,76
23	+	+	-	+	2	4,38
24	-	+	-	+	2	6,48
25	-	+	-	+	4	5,93
26	-	-	-	-	1	6,59
27	-	-	-	-	0	6,7
28	-	+	-	+	2	5,86
29	-	-	-	-	1	6,50
30	-	+	-	+	1	6,44

^a Ausencia de crecimiento (-) y presencia de crecimiento (+).

^b Escala desde la ausencia de cambios en el pH (0) a acidificación fuerte (4).

crecer a pH 4,0 (11 estirpes) fue menor que aquellas que toleraban el pH 9,5 (18 estirpes), y siete aislados fueron capaces de crecer a ambos pH.

La tolerancia a la acidez no estuvo tampoco relacionada con el pH del suelo del que las bacterias fueron aisladas, por ejemplo, sólo dos de las cinco estirpes citadas arriba (21 y 23) fueron tolerantes al ácido.

Ninguna de las cuatro estirpes pertenecientes al grupo de pH final 6,7-6,9 en medio YM, fueron capaces de crecer a pH 4,0. En los grupos de acidificación 2, 3 y 4 se verificó un incremento de la tolerancia a pH 4,0, caracterizándose el 28%, 46% y 50% de las estirpes respectivamente.

Cinco de las estirpes tolerantes al ácido se aislaron de zonas de no laboreo, representando el 45% de los aislados de estas áreas; en suelos cultivados representan el 32% de las estirpes.

Para confirmar el alto número de estirpes tolerantes a la alcalinidad, se realizó una prueba con medio tamponado. Tras este estudio se observó 23 estirpes pueden crecer a pH 8,9 mientras que sólo dos cepas, 17 y 21, ambas de lugares nunca cultivados con soja, mostraron crecimiento en medio tamponado con pH 4,0 (Tabla 9).

1.5. Tolerancia a la salinidad y temperaturas altas.

Dieciocho estirpes fueron tolerantes a NaCl 0.5M y todas mostraron al menos un débil crecimiento a 37°C (Tabla 10).

Tres estirpes, 11, 15 y 18, no pudieron crecer a 40°C, así como tampoco toleraron altos niveles de salinidad.

Esas tres estirpes, y otras cuatro (26, 27, 29 y 30) fueron aisladas de regiones subtropicales más frías, en el Estado de Paraná y Río Grande do Sul.

De todas formas, había variedades aisladas de esos dos estados (como las del 1 al 10, 17, 19 y 20) que podían crecer a 40°C, por lo que la tolerancia a la temperatura no está relacionada con el clima que hay en las zonas de procedencia de las bacterias. La tolerancia a las altas temperaturas tampoco estaba relacionada con la producción de mucosidad.

Las siete estirpes identificadas como capaces de crecer en medio TY e YM con pH=4,0 y 9,5 (2, 7, 10, 14, 17, 21 y 23) fueron también tolerantes a la salinidad y a las altas temperaturas.

TABLA 10. Tolerancia a la salinidad y altas temperaturas, crecimiento en medio LB y síntesis de melanina por las 30 estirpes de sinorrizobios brasileños aislados.

Estirpe	NaCl (M)			Temperatura (°C)		Medio LB	Síntesis de melanina
	0.1	0.3	0.5	37	40		
1	+ ^a	+	+	+	+	+	++++ ^b
2	+	+	+	+	+	+	+++
3	+	+	+	+	+	+	++
4	+	+	+	+	+	+	-
5	+	-	-	+	+	-	+++
6	+	+	+	+	+	+	a
7	+	+	+	+	+	+	++
8	+	-	-	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	a
10	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	-	d	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	a
13	+	+	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	+	+	+++
15	+	+	-	d	-	+	++
16	+	-	-	+	+	-	-
17	+	+	+	+	+	+	a
18	+	-	-	d	-	-	-
19	+	-	-	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	-
21	+	+	+	+	+	+	+
22	+	-	-	+	+	+	a
23	+	+	+	+	+	+	++
24	+	+	+	+	+	d	+
25	+	+	+	+	+	+	++
26	+	-	-	+	d	-	-
27	+	-	-	+	d	-	+
28	+	+	+	+	+	+	-
29	+	-	-	+	d	-	+
30	+	-	-	+	d	-	+

^a Ausencia de crecimiento (-) crecimiento (+) y crecimiento débil (d), correspondiente al 10-20% del crecimiento normal.

^b Para la melanina, la escala va desde (+), cuando existe producción de melanina, hasta (++++), para una secreción muy fuerte; la (a) indica la aparición de un pigmento amarillo oscuro.

1.6. Crecimiento en LB y síntesis de melanina.

Veinte estirpes crecieron bien en medio LB (Tabla 10).

La síntesis de melanina, en medio enriquecido con triptófano, se realizó por 16 estirpes (Tabla 10), y el tratamiento para romper las células (Cubo y col., 1988) no fue necesario para visualizar el pigmento oscuro producido. Otros cinco aislados produjeron un pigmento amarillo oscuro desconocido, y no fueron considerados como positivos para este parámetro.

1.7. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

Todas las estirpes crecieron bien en glucosamina, glucosa, ácido glutámico, manitol, manosa, succinato y sacarosa. Ninguna pudo usar el citrato, y el crecimiento en dulcitol fue pobre (Tabla 11).

Se detectaron siempre diferencias entre estirpes en relación a la capacidad para usar las otras fuentes de carbono probadas, por ejemplo, el 67% de las estirpes pudieron crecer con fructosa y galactosa, y el 43% usó ribosa.

Todas las estirpes utilizaron todos los componentes probados como única fuente de nitrógeno, excepto la glicina, aunque se detectaron diferencias en relación a la mayor o menor capacidad de crecimiento con cada fuente. De todas formas, ninguna de las estirpes logró crecer satisfactoriamente usando alantoína o alguno de los diez aminoácidos probados como fuentes únicas de carbono y nitrógeno.

En general, la degradación de las fuentes de carbono provocó una fuerte acidificación del medio, excepto con malato, piruvato y succinato, en los que se produjo una reacción alcalina. No existieron cambios apreciables en el pH con el uso de glicerol y almidón.

El grupo de análisis fenotípico, considerando 17 fuentes de carbono y 24 de nitrógeno creó dos grandes grupos de estirpes con un nivel de similitud relativa de 0,104 (Figura 6). El grupo II incluía siete estirpes con baja capacidad de uso de fuentes de carbono, y un menor crecimiento con los compuestos de nitrógeno

TABLA 11. Utilización de distintos compuestos como fuentes de carbono por las estirpes de sinorizobios brasileños aislados.

Fuente de Carbono	Estirpes																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Casina	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	d	d	0,5	d	d	0,5	0,5	0,5	d	d	0,5	d	d	0,5	0,5	d	0,5	d	d	d	d	d	d	d	
D(+)-celobiosa	1	1	1	d	1	d	1	0	0,5	1	d	d	0,5	0,5	0,5	0	1	1	0	1	0,5	0,5	d	0	1	1	0	1	0	0	
D(-)-fructosa	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	1	0,5	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	0,5	d	0,5	d	d	d	d	d	
D(+)-fucosa	1	1	d	0	1	d	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	d	0	d	d	d	0,5	1	0,5	0	0	0	0	0	
D(+)-galactosa	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	1	0,5	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	0,5	d	0,5	d	d	d	d	d	
Gluconato	1	0,5	d	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	d	1	d	0,5	1	1	1	0,5	d	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0	1	d	0,5	1	1	
D(+)-glucosamina	2	2	1	0,5	2	0,5	2	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	2	2	0,5	1	1	0,5	1	1,5	1,5	0,5	1	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5	
D(+)-glucosa	2	2	1	1	2	1,5	2	1	1	1	1	1	1	1,5	2	1	2	1,5	1	1,5	1,5	1,5	1	1	2	1	1	1	1	1	
Acido L-glutámico	2	2	2	2	2	2	2	1,5	2	2	1,5	2	2	2	2	1,5	2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2	1,5	1,5	2	1,5	1,5
Acido glutárico	0,5	0,5	d	d	0,5	d	0,5	d	d	d	0,5	d	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	d	0,5	0,5	d	d	0,5	0,5	d	
Glicerol	0,5	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	d	d	0,5	d	d	d	0,5	0,5	d	d	d	d	d	d	d	d	d	0,5	d	0,5	d	d	d	d
D-lactosa	2	2	1	0,5	2	0,5	2	0,5	0,5	d	d	d	1	2	1,5	d	1	1	d	0,5	d	d	d	1	1	d	d	1	d	d	
Malato	1	1	d	0	1	d	1	0	d	d	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	d	1	d	1	1	0	0	0,5	0	0	
Maltosa	1,5	1,5	1	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	0,5	1	d	d	d	1,5	1,5	d	1	1	0,5	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
D-mantol	2	2	2	2	2	2	2	1,5	2	2	1,5	2	2	2	2	1,5	2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2	1,5	1,5	2	1,5	1,5
D(+)-manosa	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	1	1	1
Miconozitril	2	2	1	d	2	0,5	2	d	1	d	d	d	d	1,5	2	0	d	1,5	0	1,5	0,5	1,5	0,5	1	2	0	0	1	0	0	
Piruvato	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	d	d	0,5	d	d	0,5	0,5	0,5	d	d	0,5	d	d	0,5	0,5	d	0,5	d	d	d	d	d	d	d	d
D(+)-rafinosa	1	1	d	d	1	d	1	0	0,5	d	d	0	d	1	1	0	d	1	0	1	1	1	d	1	1	d	d	d	d	d	d
α-L-ranrosa	1	1	1	1	0,5	0,5	1	d	d	0,5	1	0,5	0,5	1	1	1	1	d	0,5	d	d	0,5	0,5	0,5	1	0,5	d	1	d	d	
D(-)-ribosa	1	1	d	0	1	0	1	d	d	d	d	0	0	1	1	0	1	1	d	1	1	1	d	1	1	d	d	d	d	d	d
D-sorbitol	0,5	0,5	d	d	0,5	d	0,5	d	d	d	0,5	d	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	d	0,5	0,5	0,5	d	0,5	0,5	d	d	0,5	0,5	d	
Sucinato	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	1	1	1
Sacarosa	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	0,5	1,5	1,5	0,5	1,5	1,5	1	1	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	

^a La escala va desde 0 (sin crecimiento), d (crecimiento débil) y 3 (crecimiento vigoroso), en relación al control.

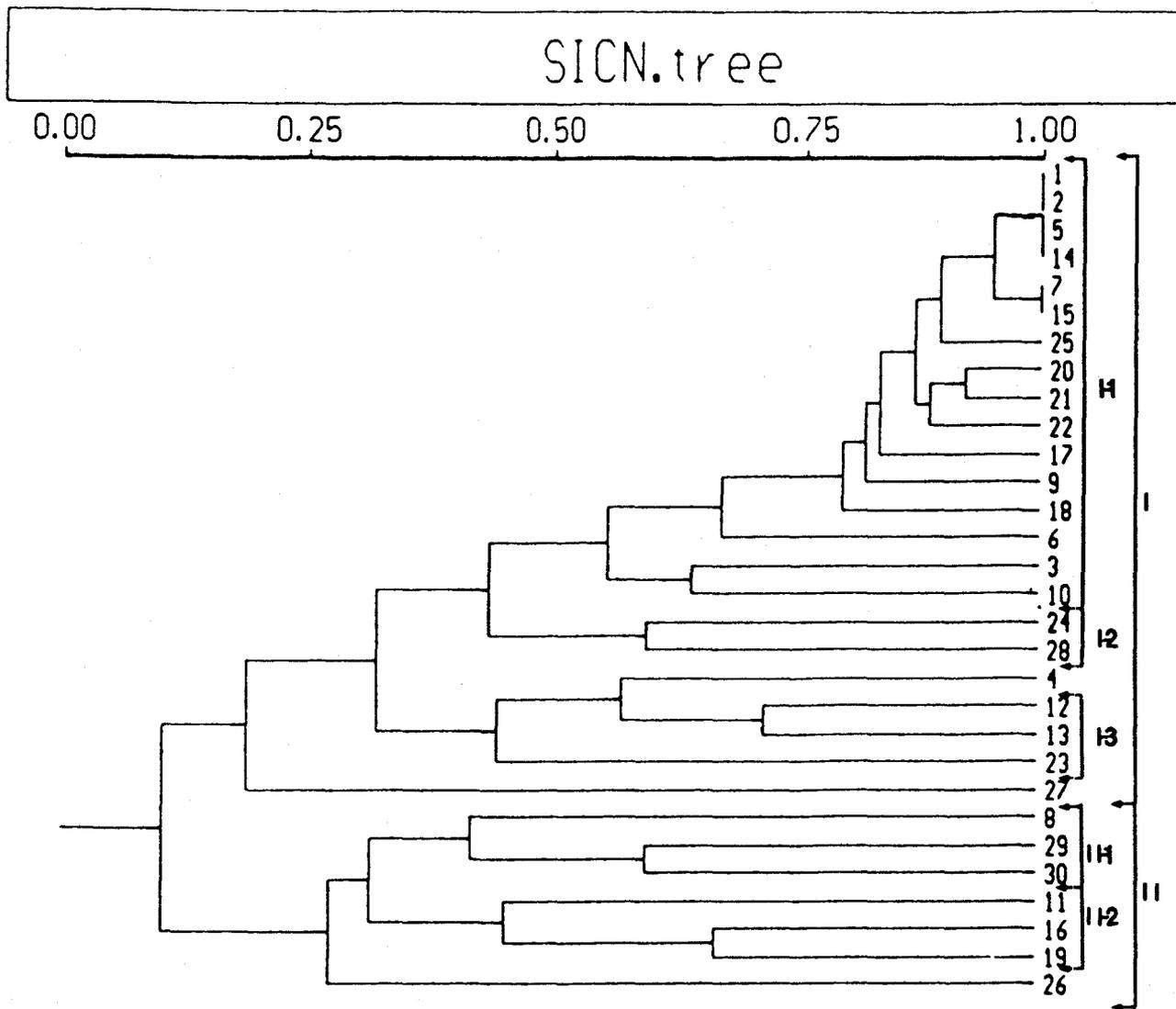


Figura 6. Dendograma en el que se muestran similitudes fenotípicas de estirpes de sinorrizobios brasileños. teniendo en cuenta el uso de 41 compuestos como únicas fuentes de carbono o nitrógeno (método UPGMA y coeficiente Jaccard).

probados (Tabla 12). Seis de esas estirpes venían de áreas previamente inoculadas. Dentro del grupo I, se relacionaron tres subgrupos en un nivel de 0,320, y una estirpe separada (27). Las seis primeras estirpes del grupo I fueron aisladas de suelos de Paraná previamente inoculados con soja, cinco de ellas de zonas cultivadas bajo métodos tradicionales; estas estirpes fueron las más eficientes en la utilización de carbono y nitrógeno. Ocho de las once estirpes aisladas de suelos inalterados fueron ubicadas en el subgrupo I-1. La comparación de las matrices con el fenotipo y los datos de utilización de C/N resultó con una correlación de $r=0,626$ (P menor a 0,01).

1.8. Resistencia intrínseca a antibióticos y a metales pesados.

La mayoría de las estirpes fueron resistentes a bajos niveles de: eritromicina (50 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina (10 $\mu\text{g/ml}$) y rifampicina (5 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 13).

Los mayores niveles de cada antibiótico tolerados por la mayoría de las bacterias fueron:

cloranfenicol	(10 $\mu\text{g/ml}$)	57% de las estirpes
eritromicina	(5 $\mu\text{g/ml}$)	97% de las estirpes
gentamicina	(20 $\mu\text{g/ml}$)	60% de las estirpes
kanamicina	(30 $\mu\text{g/ml}$)	70% de las estirpes
rifampicina	(20 $\mu\text{g/ml}$)	60% de las estirpes
tetraciclina	(10 $\mu\text{g/ml}$)	70% de las estirpes

En general, la resistencia a la estreptomina fue baja para todas las estirpes. USDA205 y CCBAU114 fueron susceptibles a 20 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina .

El análisis fenotípico ha demostrado que las estirpes encajan en dos grupos, con un nivel de significación de 0,308. Estos grupos son (Figura 7):

Grupo I: estirpes 1, 2, 10, 7, 15, 14, 23, 28, 19, 20, 26, 30, 27, 25, 5, 17, 18 y 21.

Grupo II: estirpes 3, 4, 6, 13, 9, 12, 8, 24.

Las estirpes 11, 16, 22 y 9 fueron separadas de los grupos en unos niveles de similitud relativa de 0,240 y 0,229 respectivamente.

Las correlaciones obtenidas entre la matriz de resistencia intrínseca a los antibióticos, y las matrices con el fenotipo y la utilización de C/N fueron $r=0,333$ y $r=0,172$, respectivamente (P < 0,01).

TABLA 12. Utilización de distintos compuestos como fuentes de nitrógeno por las estirpes de rizobios brasileños.

Fuente de Nitrógeno	Estirpes																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Adenina	3 ^a	2,5	1	1,5	2,5	2	2,5	1	2	2	1	1	1	2,5	2,5	1	1,5	1	0,5	2	1,5	2,5	1	1	2,5	0,5	1,5	1	0,5	0,5
L-alanina	2	2	1	1,5	2	1	2	1	2	1,5	1	1,5	1,5	2	2	1	1	1,5	0,5	2	2	2	2,5	1,5	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5
Alantofina	2	2	1	1,5	2	1	2	1	2	1,5	1	1,5	1,5	2	2	1	1	1,5	0,5	2	2	2	2,5	1,5	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5
L-arginina	2	2	2,5	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2,5	2	0,5	2	2	2	1	0,5	2	1	1	1	1	1
L-asparagina	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1
L-cisteína	2,5	2	2	1	2,5	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2,5	2	1	2	2	2	1,5	1	2	1	1	1	1	1
L-cistina	2,5	2	2	1	2,5	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2,5	2	1	2	2	2	1,5	1	2	1	1	1	1	1
Citosina	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1,5	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
L-glutamina	2,5	2,5	2,5	1,5	2,5	2,5	2,5	1	2,5	2	1	1,5	1,5	2	2,5	1	2,5	2,5	1	2,5	2,5	2,5	1	2,5	2	1	1,5	1,5	2	2,5
Quantia	2	2	1	1	2	1	2	1	1,5	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1,5	2	1,5	1	1,5	1	1
L-histidina	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	0,5	2	2	2	1	1,5	2	1	1	1,5	1	1
L-isoleucina	2,5	2,5	1,5	1	2,5	2	2,5	1	2,5	2,5	1	1,5	1,5	2,5	2,5	1	2,5	2,5	1	2,5	2,5	2,5	2	1,5	2,5	1	2,5	1	1	1
L-leucina	2	2	1,5	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
L-lisina	2	2	1,5	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
L-metionina	2	2	2	1	2	1,5	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1,5	1,5	2	1	1	1,5	0,5	0,5
L-fenilalanina	2,5	2	1,5	1	2,5	2	2	1	2,5	2	1	1,5	1,5	2	2	1	2,5	1	1	2	2	2,5	2	1,5	2	1	1	1,5	1	1
L-prolina	2	2	1,5	1,5	2	1	2	1	2	1,5	1	1	1,5	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1,5	1	2	1	2	1	1	1
L-serina	2	2	1	1	2	1,5	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2,5	1,5	1	2	2	2	1,5	1	2	2	1	1	1	1
L-treonina	2	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1,5	1,5	1	2	1,5	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Timina	2	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1,5	1,5	1	2	1,5	2	1	1	2	1	1	1	1	1
L-triptofano	2	2	1,5	1,5	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1,5	2	1	2	1	1	1
L-tirosina	2	2	1,5	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
Uracilo	2	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1,5	1,5	1	2	1,5	2	1	1	2	1	1	1	1	1
L-valina	2	2	1	1	2	1,5	2	1	2	1,5	1	1	1	2,5	2,5	1	1,5	2	1	2	2	2	2	1,5	2	1	2	1,5	1	1

^a La escala va desde 0 (sin crecimiento) hasta 3 (crecimiento vigoroso), en relación al control.

TABLA 13. Resistencia intrínseca a los antibióticos de 30 estirpes de sinorizobios brasileños aislados. Se indican tres concentraciones diferentes (en $\mu\text{g/ml}$) de siete antibióticos.

Estirpe	Cm			Eri			Gm			Km				Rif			Str			Tc		
	10	20	40	50	75	100	10	20	40	10	20	30	5	10	20	50	75	100	10	20	40	
1	+ ^a	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	d	-	
3	+	d	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	+	d	-	
4	-	-	-	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	d	-	
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
6	d	d	-	+	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	d	-	
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-	-	
8	-	-	-	+	+	-	+	d	-	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	+	+	d	+	+	d	+	+	+	+	+	d	d	-	-	+	d	-	
10	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	
11	d	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	d	-	
12	-	-	-	+	+	d	+	+	d	+	+	+	+	+	d	-	-	-	+	-	-	
13	-	-	-	+	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d	-	
15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
16	d	-	-	+	-	-	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	d	-	-	
17	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	d	-	-	
18	d	-	-	+	+	d	-	-	-	+	+	+	+	+	d	+	+	-	-	-	-	
19	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	-	-	-	
21	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d	
22	d	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
23	+	-	-	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
24	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	+	+	d	-	-	+	d	-	
25	d	+	+	+	+	d	-	-	-	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	
26	+	+	+	+	d	d	+	+	-	+	+	d	+	-	-	+	+	+	+	+	d	
27	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
29	-	-	-	d	-	-	+	-	-	+	+	d	+	d	-	-	-	-	-	-	-	
30	+	+	+	+	d	d	+	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

^a Ausencia de crecimiento (-) presencia de crecimiento (+) equivalente a más del 50% del crecimiento del control sin antibióticos; la d indica crecimiento débil, correspondiente al 10-20% del crecimiento normal.

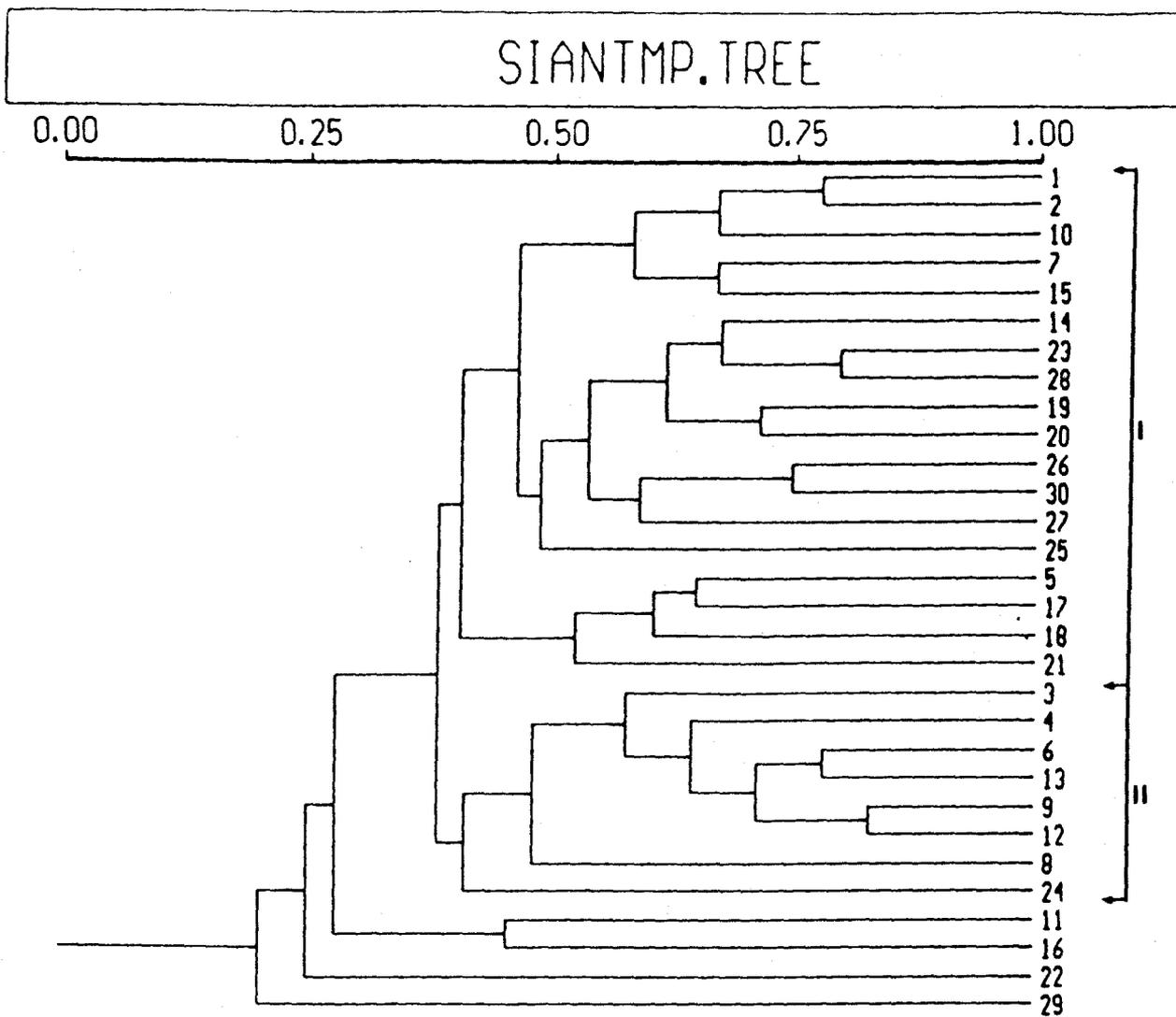


Figura 7. Dendograma en el que se muestran similitudes fenotípicas de estirpes de sinorrizobios brasileños, teniendo en cuenta los datos de resistencia a tres niveles de siete antibióticos y los de tolerancia a tres niveles de cinco metales pesados.

Las estirpes no fueron tolerantes a las concentraciones probadas de níquel y plomo, pero la mayoría de las bacterias mostraron resistencia intrínseca a 0,5mM de cloruro de cobalto (67% de las estirpes) y 0,25mM de cromato potásico (65% de las estirpes)

(Tabla 14)

Se formaron cinco grupos genéticos con estos datos (Figura 8).

Cuatro grupos se relacionaron en un nivel de similitud 0,151, y encabezando el grupo I se encontraban las estirpes 1 y 2, tolerantes a seis niveles de metales pesados. El quinto grupo estuvo a gran distancia, e incluyó a las estirpes sin resistencia intrínseca a los metales pesados (8,11,24 y 27).

Coefficientes de correlación bajos y no significativos se obtuvieron entre la matriz de tolerancia a metales pesados, y las matrices con el fenotipo ($r=-0,066$), uso de C/N ($r=-0,099$) y resistencia intrínseca a antibióticos ($r=-0,069$). Consecuentemente, los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a metales pesados no fueron considerados en el dendograma fenotípico final.

De todas formas, es importante exponer que los valores cofenéticos obtenidos para cada una de las cuatro matrices citadas aquí, fueron mayores de 0,91, indicando un excelente ajuste de las agrupaciones de los bloques de datos.

1.9. Análisis genético con cebadores ERIC y REP mediante PCR.

La amplificación por PCR con los cebadores ERIC y REP ha generado más de 30 productos de PCR por estirpe. De todas formas, algunas estirpes han generado menos bandas (por ejemplo, la estirpe 10 produjo dos bandas con REP) o ninguna (por ejemplo, la estirpe 3 con REP y ERIC). Las bandas fueron combinadas para producir un dendograma, y debido a la ausencia de bandas de la estirpe 3, ésta no se incluyó en el análisis.

La mayoría de las variedades brasileñas encajan en uno de los grandes grupos divididos en cuatro subgrupos en el nivel de similitud 0,78 (Figura 9).

En el grupo I se incluyó *S. fredii* CCBAU114, dos estirpes de suelos inalterados y cuatro variedades de suelos cultivados con soja, bajo métodos de cultivo no tradicionales.

TABLA 14. Tolerancia de 30 estirpes de sinorizobios brasileños aislados a tres niveles de metales pesados.

Estirpes	Cd			Co			Cr			Se			Pb		
	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0	0.25	0.5	1.0	5	10	20	2.5	5	10
1	d ^b	d	-	+	+	-	+	d	-	+	+	+	-	-	-
2	d	d	-	+	+	-	+	d	-	+	+	+	-	-	-
3	-	-	-	+	+	d	+	+	-	+	d	d	-	-	-
4	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	d	d	d	d	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	d	-	-	d	d	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
7	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	-	-	-	-	-
8	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	+	-	d	d	-	-	-	-
10	+	d	d	-	-	-	+	d	-	+	+	+	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	+	d	-	d	d	-	-	-	-
14	-	-	-	+	-	-	+	d	-	d	d	-	-	-	-
15	+	d	-	+	d	-	+	d	-	-	-	-	d	-	-
16	+	+	+	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
17	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	d	-	-	-	-
21	+	+	+	+	d	d	+	d	d	-	-	-	d	d	-
22	+	+	+	+	d	d	d	d	-	+	+	d	-	-	-
23	d	-	-	+	+	+	+	+	d	+	+	d	d	-	-
24	d	-	-	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-	-	-
25	+	d	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	d	-	-
26	+	d	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	d	-	-
27	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-
28	-	-	-	+	+	d	+	d	-	+	d	-	d	-	-
29	d	-	-	+	d	-	-	-	-	d	-	-	d	-	-
30	d	-	-	+	+	+	-	-	-	d	-	-	d	-	-

^aConcentraciones en mM de cloruro de cadmio, cloruro de cobalto, cromato potasico, sulfuro de selenio y acetato de plomo. Ninguna bacteria crecio con sulfato de niquel (0,5, 1,0 y 2,0 mM).

^bAusencia de crecimiento (-), y crecimiento (+) equivalente a mas del 50% del crecimiento del control sin metal pesado; la d indica crecimiento debil, correspondiente al 10-20% del crecimiento normal.

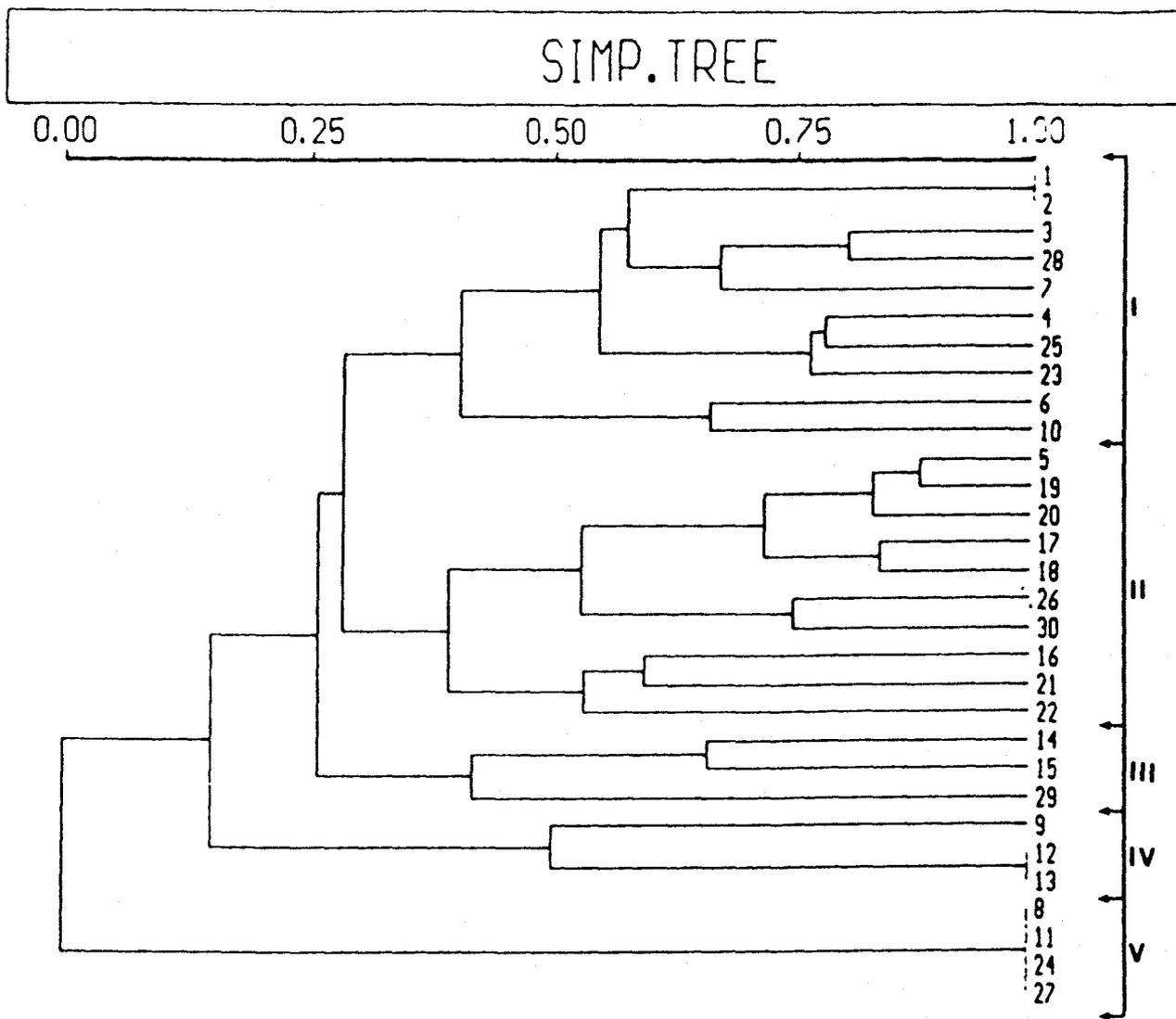


Figura 8. Dendograma en el se muestran las similitudes fenotípicas de 30 estirpes de sinorizobios brasileños, teniendo en cuenta los datos de tolerancia a tres niveles de metales pesados.

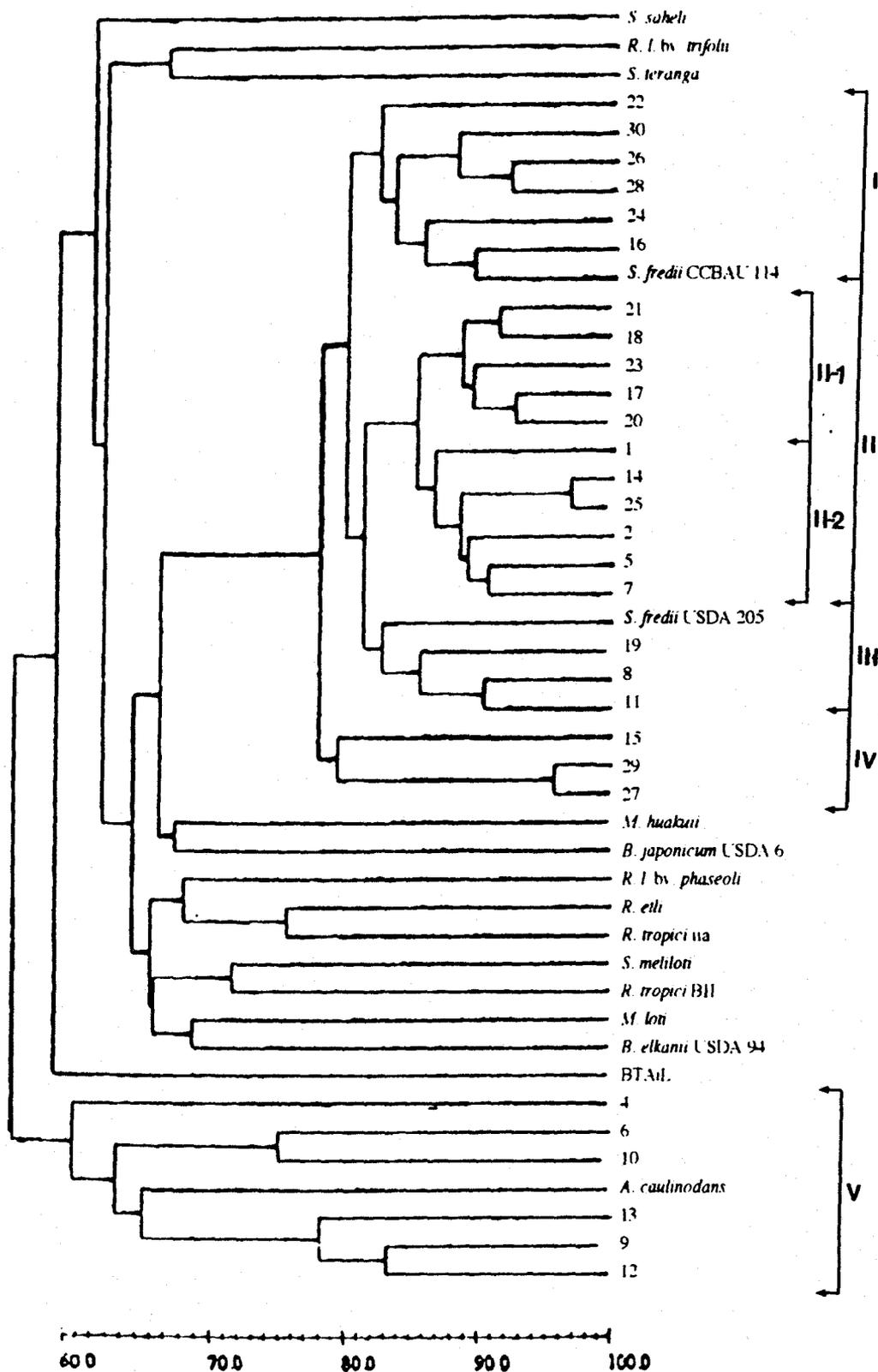


Figura 9: Dendrograma generado a partir del análisis genético con cebadores ERIC y REP mediante PCR.

El grupo II pudo ser subdividido en un nivel de similitud relativa de 0,85; el subgrupo II-1 incluyó cinco estirpes de suelos inalterados, aislados de lugares alejados (AM, DF, RS) y en el subgrupo II-2 se incluyó una estirpe de suelo inalterado (AM) y cinco estirpes de suelos cultivados con métodos convencionales.

El grupo III estaba relacionado con el segundo y el primero en unos niveles de similitud de 0.81 y 0.80, respectivamente, e incluye a *S. fredii* USDA 205, una estirpe de suelos inalterados (RS) y dos estirpes aisladas de suelos cultivados según métodos no convencionales.

Finalmente, el grupo IV, incluye tres estirpes de áreas con suelos sometidos a métodos no tradicionales de cultivo.

Estos cuatro grupos fueron situados entre dos grupos de estirpes representativas de distintas especies de rizobios.

Un grupo separado, unido a los otros con un nivel de similitud de 0.56, incluye seis estirpes de suelos inalterados o cultivados por sistemas tradicionales, o no tradicionales, del Estado de Paraná.

De todas formas, estas fueron las estirpes que produjeron pocas bandas por la amplificación con los cebadores ERIC y REP. La amplificación realizada utilizando distintas extracciones de ADN, lisado de células y diferentes termociclos, pero las huellas de estirpes con pocas bandas fueron reproducibles. Consecuentemente, el agrupamiento se realizó debido a la ausencia de amplificación con esos cebadores repetitivos.

2. Dendograma fenético general.

En la Figura 10 puede verse el dendograma final obtenido con 81 parámetros morfológicos y fisiológicos. El valor cofenético obtenido para la matriz fue de 0,95, mostrando una buena correspondencia en el agrupamiento de los datos. Hay dos grandes grupos fenéticos vinculados, con un nivel de similitud relativa de 0,182.

Dentro del grupo I hay cuatro subgrupos relacionados con un nivel de similitud relativa de 0,388. Las variedades originadas de suelos inalterados cubiertos con vegetación nativa, representadas en números marcados, ocupan las posiciones de la parte central de dendograma, el final del subgrupo I-1, I-2 y I-4. En la cabecera del subgrupo I-1 hay colocadas seis estirpes de áreas cultivadas con soja, cinco de ellas procedentes de suelos que han sido laborados con sistemas tradicionales. El grupo II

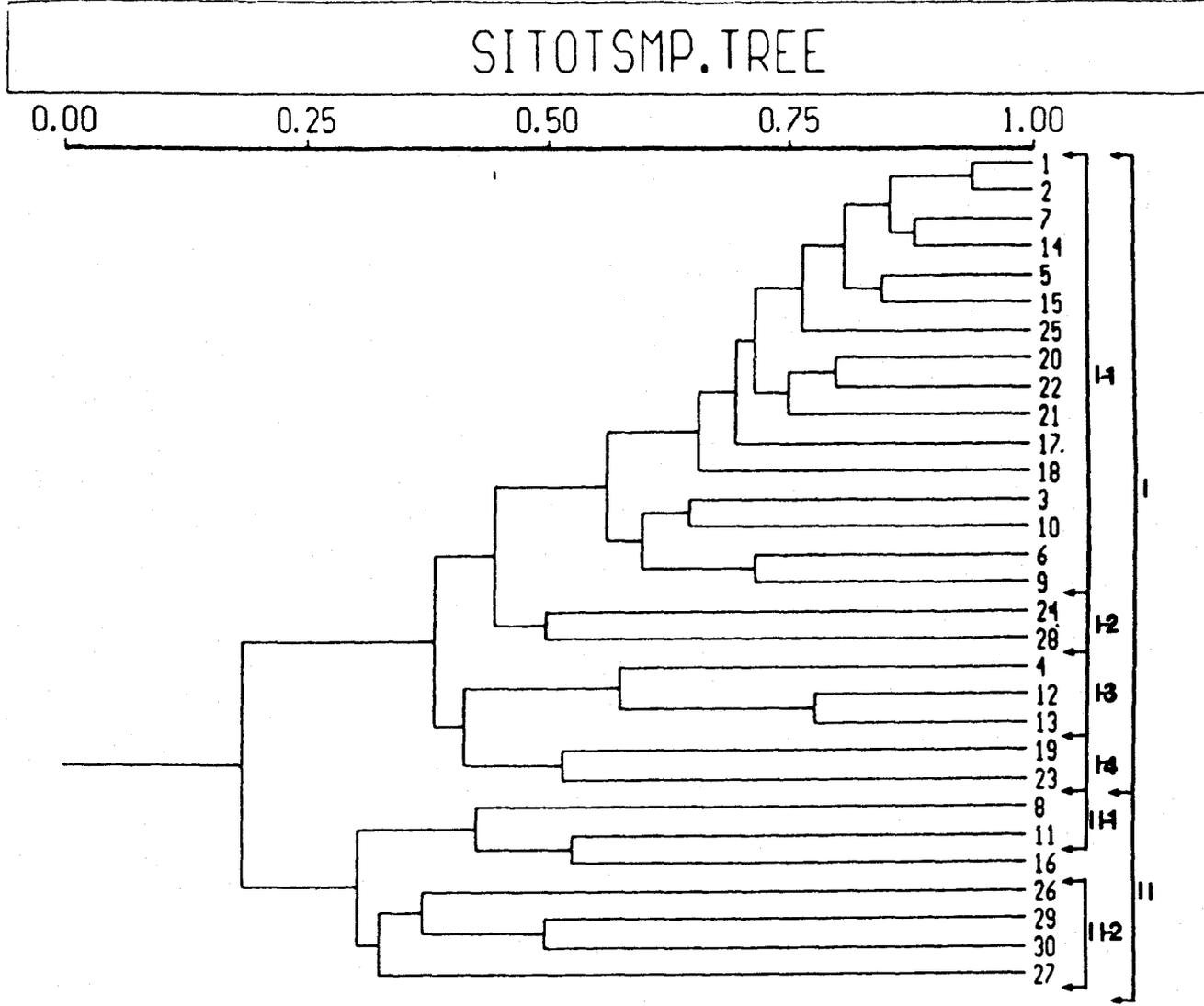


Figura 10. Dendrograma fenotípico (método UPGMA y coeficiente Jaccard) mostrando las similitudes entre sinorrizobios brasileños cuando se tuvieron en cuenta 81 parámetros (20 características morfológicas y fisiológicas, 41 compuestos como únicas fuentes de carbono y nitrógeno y 20 resultados de resistencia intrínseca a los antibióticos).

abarca dos subgrupos relacionados en un nivel de similitud relativa de 0,308 con siete estirpes, todas de áreas cultivadas con sistemas no tradicionales.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Dado que en Brasil existe la combinación de una elevada diversidad de leguminosas nativas, y bajo contenido en nitrógeno en los suelos, implica que se realizan frecuentes descripciones de nuevos géneros y especies de nodulación efectiva (Moreira, 1994) y exista aún, una gran diversidad de estirpes de rizobios sin clasificar (Moreira y col., 1993). La soja es una planta exótica en Brasil, y los primeros experimentos realizados en el país dieron como resultado ausencia de nodulación o pocos nódulos en ausencia de inoculantes extranjeros (Freire, 1977; Vargas y Suhet, 1980). Podría suceder que los pocos nódulos observados fueran formados por rizobios o bradirrizobios nativos, y no por contaminantes de semillas. Experimentos posteriores evaluaron la ocupación de los nódulos por reacciones de aglutinación serológica, y, aunque uno de cada tres nódulos no reaccionó con ningún serogrupo de bradirrizobio conocido (Hungria y col., 1994; Vargas y Hungria, 1997), no se realizaron estudios más profundos con los aislados de estos nódulos. Consecuentemente, tampoco hay estudios de *Sinorhizobium fredii* que haya sido aislado de nódulos de soja en Brasil.

S. fredii parece haber coevolucionado con la planta de soja (Devine, 1985), pero el gran rango de huéspedes de la bacteria (Keyser y col., 1982; Stowers y Eaglesman, 1984; Chen y col., 1988; Buendía-Clavería y col., 1989; Rodríguez-Navarro y col., 1996) muestra que las bases para esta coevolución no han sido establecidas aún. En el presente estudio las estirpes de rizobios fueron detectadas en 12 de los 22 suelos brasileños investigados, siendo "atrapadas" por genotipos de soja no mejorados genéticamente y uno mejorado, representando más del 24% de las bacterias aisladas de los nódulos.

Los sinorrizobios brasileños tuvieron un tiempo de generación de entre 85 y 225 minutos. Las colonias muestran forma circular y elevación convexa en YMA, como describe Scholla y Elkan (1984), pero al contrario de como describen estos autores, en la mayoría de las estirpes se pudo observar una abundante mucosidad. De

todas formas, la descripción enumerada de los géneros de *Sinorhizobium* por La Judie y col. (1994) también indican una copiosa producción extracelular de polisacárido.

Así como USDA205 y CCBAU114, cinco estirpes fueron susceptibles a 20 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y en tres de ellas, el pH en medio YM después de cuatro días, disminuyó a valores bajo 6,1 (Scholla y Elkan, 1984). Dentro de las 25 estirpes tolerantes, solo 9 ocasionaron un pH superior a 6,1 (14 estirpes tuvieron un pH mayor de 5,99), por lo tanto se podrían denominar quimiovariedad *sinensis*.

Seis variedades fueron acidificadores fuertes, decreciendo el pH a niveles por debajo de 4,4; las otras estirpes resultaron con un pH final entre 5,0 y 6,1.

La mayoría de las estirpes brasileñas (60%) mostraron una extraordinaria característica de crecimiento a pH 9,5, contrariamente a los informes previos de Scholla y Elkan, (1984) y a más del 95% de las estirpes estudiadas por Chen y col. (1988). Aunque las estirpes fueron aisladas de suelos ácidos (pH=3,04-5,09), la capacidad de crecer a pH=4,0 fue baja, como se observó para otras variedades de *S. fredii* (Chen y col., 1988); de todas formas, la actividad de los protones en un medio líquido es diferente que en el suelo, donde las cargas de los coloides pueden neutralizar parcialmente la actividad de los iones.

Aunque la salinidad no suele ser un problema en suelos brasileños, el 60% de las estirpes fueron tolerantes a 0,5M en ClNa. Otras variedades de *S. fredii* fueron inhibidas por una concentración del 2 al 3 % (0,5M) de NaCl (Scholla y Elkan, 1984 ; Stowers y Eaglesham, 1984; Buendía- Clavería y col., 1989), sin embargo, la estirpe vietnamita HH103 también muestra alguna tolerancia a la salinidad (Rodríguez-Navarro y col., 1996).

La mayoría de las estirpes (77 %) toleraron las temperaturas altas, creciendo a 40°C.

El crecimiento en medio LB fue positivo en el 67% de las estirpes, y este parámetro puede ser usado para distinguir grupos de estirpes, por ejemplo, *R. tropici* IIA de *R. tropici* IIB (Martínez-Romero y col., 1991), aunque las bases para esta capacidad aún no están claras.

La mayoría de las estirpes fueron productoras de melanina (53 %), pero esto es una característica general entre las estirpes de rizobios, con un papel ecológico desconocido (Cubo y col. 1997), así que no es frecuente usarlo para caracterizar grupos de rizobios (Martínez-Romero y col., 1991).

En general, las estirpes brasileñas fueron capaces de usar varios componentes como únicas fuentes de carbono, como se conocía para otras estirpes de *S. fredii* (Scholla y Elkan, 1984; Stowers y Eaglesham, 1984; Chen y col., 1988; Buendía-Clavería y col., 1989; La Judie y col., 1994; Novikova y col., 1994; Rodríguez-

Navarro y col., 1996). Todas las estirpes pudieron crecer con glucosamina, glucosa, ácido glutámico, manitol, manosa, sacarosa y succinato, aunque se observaron diferencias entre las estirpes en relación al uso de las otras 17 fuentes de carbono, por ejemplo, el 60% y el 43% de las estirpes fueron capaces de usar celobiosa y rafinosa respectivamente. Los rizobios no pudieron utilizar citrato, y presentaron un bajo crecimiento en dulcitol, como ya se había observado, para una o ambas fuentes de carbono, con otras estirpes de *S. fredii* (Stowers y Eaglesham, 1984; Buendía-Clavería y col., 1989; La Judie y col., 1994; Rodríguez-Navarro y col., 1996; van Berkum y col. 1998).

La maltosa fue utilizada por el 87% de las estirpes, pero no por USDA 205 (van Berkum y col., 1998) y fueron altamente eficientes en el uso de sacarosa, así como los descritos por Buendía-Clavería y col., (1989) y contrariamente a los estudios de sinorrizobios por Chen y col. (1988).

Se produjo una reacción ácida por el uso de la mayoría de las fuentes de carbono, pero se dio una reacción alcalina al utilizar malato, piruvato y succinato, intermediarios del ciclo de Krebs, como se observó por Stowers y Eaglesham (1984).

En un medio definido provisto de glucosa, las distintas estirpes mostraron una amplia capacidad para utilizar varios componentes como únicas fuentes de nitrógeno, contrariamente a USDA205 (van Berkum y col., 1988). De todas formas, aunque Novikova y col., (1994) concluyeron que USDA198 podría utilizar varios aminoácidos como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, ninguna de las estirpes brasileñas mostraron esta habilidad.

Los dendogramas obtenidos con parámetros morfológicos y fisiológicos, o con datos del uso del carbono y nitrógeno, posicionaron a la mayoría de las estirpes aisladas de zonas inalteradas en los subgrupos centrales. En la zona alta del dendograma fueron puestas la mayoría de las estirpes de suelos previamente inoculados bajo métodos de cultivo convencionales, mientras que en al final del dendograma estaban la mayoría de las cepas aisladas de suelos con cultivo no tradicional.

En el cultivo convencional, con las prácticas tradicionales de arado de discos para preparar la tierra, se reduce la materia orgánica del suelo, y se incrementa la erosión, especialmente en los trópicos. Como alternativa, los métodos no convencionales protegen el suelo de la erosión por el agua, mejora la estructura del suelo, la estabilidad y el contenido en humedad, resultando en un incremento del contenido en materia orgánica (Hungría y col., 1997).

Los resultados obtenidos en este examen indican que incluso tras unos pocos años de prácticas no tradicionales (entre 6 y 7 años para los suelos usados en este

estudio) el mayor contenido en carbono y la presencia de fuentes de carbono fácilmente disponibles para la bacteria, disminuirían la habilidad de la población de rizobios de usar un amplio rango de componentes. Además, las condiciones de estrés asociadas al cultivo convencional, tales como temperaturas altas, humedad baja en el suelo y contenido bajo en carbono (Hungria y col., 1997), seleccionarían las estirpes tolerantes a las condiciones estresantes.

La caracterización fenotípica basada en la resistencia intrínseca a los antibióticos se ha usado tanto con un enfoque de identificación de estirpes, como para una clasificación taxonómica (Scholla y Elkan, 1984; Chen y col. 1988) así como para propósitos ecológicos (por ejemplo, Josey y col., 1979).

Los niveles de antibióticos usados en este estudio se basaron en estudios previos con *S. fredii* (Scholla y Elkan, 1984; Stowers y Eaglesham, 1994; Rodríguez-Navarro y col., 1996) y en varios estudios de resistencia natural de estirpes de rizobios nativos brasileños.

En términos ecológicos, no fue posible establecer un marco concluyente sobre los resultados obtenidos con los antibióticos, por ejemplo, dos estirpes (19 y 20) de suelos inalterados fueron altamente tolerantes, sin embargo, las estirpes 17 y 18 mostraron una baja tolerancia a los antibióticos probados.

De todas formas, los sinorizobios brasileños en general mostraron resistencia intrínseca a los antibióticos más alta que otras estirpes de *S. fredii* (Scholla y Elkan, 1984; Stowers y Eaglesham, 1984; Chen y col., 1988; Rodríguez-Navarro y col., 1996).

Las estirpes de rizobios también fueron tolerantes a los metales pesados, como cloruro de cobalto (0,5mM) y cromato potásico (0,25mM).

Las secuencias concensuadas REP y ERIC contienen repeticiones invertidas altamente conservadas, y se encuentran normalmente en regiones intergénicas transcritas pero no traducidas en proteínas (Vesalovic y col., 1991; de Bruijn, 1992). El uso de colecciones de cebadores basadas en estas secuencias con las técnicas de PCR, fue altamente específico para diversas estirpes de la familia Rhizobiaceae, y ha sido utilizada para propósitos ecológicos, genéticos y taxonómicos (de Bruijn, 1992; Madrzak y col., 1995; van Rossum y col., 1996).

Las colecciones de cebadores se distinguen entre si en relación a la detección de diferencias en el genoma (de Bruijn, 1992; Selenska-Pobell y col., 1996).

La mayoría de las variedades brasileñas fueron agrupadas dentro de un gran grupo subdividido en cuatro subgrupos relacionados en un nivel de similitud relativa de 0.78.

Dos de estos grupos incluyeron las estirpes USDA205 y CCBAU114, y, en

general, la agrupación genética mostró algunas similitudes con la agrupación fenotípica.

Uno de los grupos genéticos diseñados incluyó seis estirpes brasileñas, aunque en este grupo se incluyen aquellas estirpes que dieron una amplificación pobre o nula con estos cebadores. Judd y col.(1993) también han observado, en un estudio con bradirrízobios de soja, que algunas variedades tuvieron un patrón simple en PCR, o no amplificado con ERIC y REP, indicando que las secuencias no estuvieron bien conservadas entre estas estirpes y, como en este estudio, no fue significativo para la clasificación.

Actualmente se están realizando nuevos estudios genéticos para dar más información sobre las estirpes brasileñas.

En estos estudios, se describe por primera vez, el aislamiento de estirpes de crecimiento rápido de nódulos de soja en Brasil. Los análisis preliminares genotípicos y fenotípicos realizados con las bacterias, indican que tienen propiedades únicas, pero que encajan en las características generales de las especies de *S. fredii*. Las estirpes aisladas de zonas inalteradas, están muy relacionadas incluso cuando se aislaron de regiones distantes, indicando un antecedente común. Con el cultivo de soja, la relación entre las estirpes fue menor. El criterio básico de formación de nódulos efectivos en genotipos de soja moderna o no mejorado se puso de manifiesto para las treinta estirpes estudiadas. La Judie y col. (1994) clasificaron otras variedades brasileñas aisladas de nódulos de *Leucaena leucocephala* (BR811, BR817) como *S. fredii*, utilizando patrones electroforéticos de proteínas. De todas formas, estas estirpes también son capaces de establecer una simbiosis efectiva con judías (*Phaseolus vulgaris*), pero no con soja (Hungria y col., 1993; Hungria y Eaglesham, dato no publicado), por lo que su clasificación como *S. fredii* está aún por confirmar.

La soja es una planta introducida en Brasil, pero las variedades aisladas en este estudio tenían, probablemente, un amplio rango de hospedadores de leguminosas nativas. *Rhizobium sp.* NGR234 es otra estirpe promiscua capaz de nodular en un gran rango de leguminosas, algunas de ellas de evolución divergente (Stanley y Cervantes, 1991), y fue clasificada como *S. fredii* por el análisis de ácidos grasos celulares (Jarvis y Tighe, 1994). Consecuentemente, la coevolución de especies de *S. fredii* puede haber ocurrido, no sólo con soja, sino también con otras especies de leguminosas hospedadoras.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Una vez obtenidas las treinta estirpes en cultivos puros, y habiendo llevado a término los distintos ensayos para la determinación de la biodiversidad, podemos concluir en los siguientes puntos:

1. Todas las estirpes fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno tanto en huéspedes con genotipo moderno como en aquellos cuyos genotipos son primitivos; por lo tanto, los genotipos primitivos son tan efectivos para conseguir sinorrizobios como los mejorados.

2. La morfología de las estirpes no guarda relación alguna con el sistema de cultivo, lugar de aislamiento, o características químicas del suelo.

3. Todas las estirpes estudiadas pueden considerarse de crecimiento rápido.

4. Todas las estirpes acidifican el medio YM, estando las estirpes 8, 11 y 16, cuyo tiempo de generación es el menor de todos, encuadradas dentro del grupo menos acidificante. Sólo siete aislados (estirpes 2, 7, 10, 14, 17, 21 y 23) fueron capaces de crecer a pH extremos; es decir, pudieron crecer tanto a pH 4,0 como a pH 9,5; siendo estas estirpes tolerantes a la salinidad y a las altas temperaturas.

5. Ninguna estirpe es capaz de usar citrato como única fuente de carbono, o glicina como única proveedora de nitrógeno; tampoco se obtuvo crecimiento cuando se utilizaron distintos aminoácidos como únicos compuestos para la obtención de carbono y nitrógeno

6. Los metales pesados níquel y plomo no permiten el crecimiento de las bacterias estudiadas.

7. El material genético de las estirpe número 3 no pudo ser amplificado mediante la técnica de la PCR usando los cebadores ERIC y REP, en comparación con el resto de las estirpes donde en todos los casos se obtuvieron productos de PCR.

VII. REFERENCIAS

- **Aguilar, J. M. M., A. M. Ashby, A. J. M. Richards, G. J. Loake, M. D. Watson, and C. H. Shaw.** 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2741-2746.
- **Andrade, D. S., and P. J. Hamakawa.** 1994. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas, p.63-94. *In* M. Hungria, and R. S. Araujo (ed.), *Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola*. EMBRAPA-SPI, Brasília, Brazil.
- **Balatti, P. A., and S. G. Pueppke.** 1992. Identification of North American soybean lines that form nitrogen-fixing nodules with *Rhizobium fredii* USDA257. *Can. J. Plant Sci.* **72**:49-55.
- **Beijerinck, M. W.** 1888. Die Bacterien der Papilionaceenknollchen. *Botanische Zeitung.* **46**:797-804.
- **Bergersen, F. J.** 1980. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, 702p. John Wiley & Sons, Chichester.
- **Berkum, P. van.** USDA, Beltsville, MD, USA.
- **Buchanan, R. E.** 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**:225-240.
- **Buendía-Clavería, A. M., M. Chamber, and J. E. Ruiz-Sainz.** 1989. A comparative study of the physiological characteristics, plasmid content and symbiotic properties of different *Rhizobium fredii* strains. *System. Appl. Microbiol.* **12**:203-209.
- **Chen, W. X., G. H. Yan, and J. L. Li.** 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:393-397.

- **Chueire, L.M. de O., and M. Hungria.** 1997. N₂-fixation ability of Brazilian soybean cultivars with *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium xinjiangensis*. *Plant Soil* **196**:1-5.

- **Costilow, R. N.** 1981. Biophysical factors in growth, p.66-78. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (ed.), *Manual of Methods for General Microbiology*. ASM, Washington.

- **Cubo, M. T., A. M. Buendía-Clavería, J. E. Beringer, and J. E. Ruiz-Sainz.** 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1812-1817.

- **Cubo, M. T., F. Romero, J. M. Vinardell, and J. E. Ruiz-Sainz.** 1997. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *mela* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. *Aust. J. Plant Physiol.* **24**:195-203.

- **de Bruijn, F. J.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2180-2187.

- **Dharmatilake, A. J., and W. D. Bauer.** 1992. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1153-1158.

- **Devine, T. E.** 1985. Nodulation of soybean plant introduction lines with the fast-growing rhizobial strain USDA 205. *Crop Sci.* **25**:354-356.

- **Dreyfus, B., J. L. García, and M. Gillis.** 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:89-98.

- **Dowdle, S. F., and B. B. Bohlool.** 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1171-1176.

- **D'utra, G.** 1882. Soja. *J. Agricultor* **VII**:185-188.

- **Eardly, B. D., F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander.** 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *App. and Environm. Microbiol.* **61**:507-512.

- **Frank, B.** 1889. Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Botanische Zeitung.* **37**:377-388, 393-400.

- **Frank, B.** 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* **7**:332-346.

- **Freire, J. R. J.** 1977. Inoculation of soybeans, p.335-379. *In* J. M. Vincent, A. S. Whitney, and J. Bose (ed.), *Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture.* Niftal, Maui, Hawaii. (College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication, 145).

- **Hellriegel, H., and H. Wifarth.** 1888. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rubenzucker-Industrie Deutschen Reiches 1-234.

- **Hungria, M., A. A. Franco, and J. I. Sprent.** 1993. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* **149**: 103-109.

- **Hungria, M., D. S. Andrade, E. L. Balota, and A. Colozzi-filho.** 1997. Importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo, 9p. EMBRAPA-CNPSO, Londrina, Brazil. (Comunicado Técnico, 56).

- **Hungria, M., M. A. T. Vargas, A. R. Suhet, J. R. R. Peres, and I. C. Mendes.** 1994. Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio, p. 285-335. *In* M. Hungria, and R. S. Araujo (ed.), *Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola.* EMBRAPA-SPI, Brasília, Brazil.

- **Hymowitz, T.** 1970. On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* **24**:408-421.

- **Jarvis, B. D. W., H. L. Downer, and J. P. W. Young.** 1992. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:378-380.

- **Jarvis, B. D. W., and S. W. Tighe.** 1994. Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant and Soil.* **161**:31-44.

- **Jordan, D. C.** 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol* **32**:136-139.

- **Josey, D. P., J. L. Beynon, A. W. B. Johnston, and J. E. Beringer.** 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **46**:343-350.

- **Judd, A. K., M. Schneider, M. J. Sadowsky, and F. J. de Bruijn.** 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Brayrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1702-1708.

- **Kannenberg, E. L. and N. J. Brewing.** 1994 Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends in Microbiol.* **2**:277-283.

- **Keyser, H. H., B. B. Bohlool, T. S. Hu, and D. F. Weber.** 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. *Science* **215**:1631-1632.

- **Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine, and S. E. Udell.** 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **38**:501-505.

- **LaJudie, P. D., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, and M. Gillis.** 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:715-733.

- **Madrzak, C. J., B. Golinska, J. Króliczak, K. Pudelko, D. Lazewska, B. Lampka, and M. Sadowsky.** 1995. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1194-1200.

- **Maidak, B. L., N. Larsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy, and C. R. Woese.** 1994. The Ribosomal Database Project. *N. Acids Research.* **22**:3485-3487.

- **Maniatis, T., J. Sambrook, and E. F. Fritsch.** 1992. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York..

- **Martínez, E.** CNF, Cuernavaca, Méjico.

- **Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios.** 1990. The *Rhizobium* genome. *P. Science* **9**:59-93.

- **Martínez-Romero, E., E. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. H. Graham, and 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.

- **Moreira, F. M. S.** 1994. Fixação do nitrogênio em espécies arbóreas, p.121-149. *In* R. S. Araujo, and M. Hungria (ed.), *Microorganismos de Importância Agrícola.* Embrapa-SPI, Brasília, Brazil.

- **Moreira, F. M. S., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco.** 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:135-136.

- **Morse, W. J.** 1950. History of soybean production, p.3-59 (vol. 1). In K. L. Markley (ed.), Soybeans and Soybean Products. Interscience Publ. Inc., New York.
- **Novikova, N. I., E. A. Pavlova, N. I. Vorobjev, and E. V. Limeshchenko.** 1994. Numerical taxonomy of *Rhizobium* strains from legumes of the temperate zone. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:734-742.
- **Olsen, G. J., C. J. Woese, and R. Overbeek.** 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**:1-6.
- **Rinaudo, G., S. Orenga, M. P. Fernández, H. Meugnier and, R. Bardin.** 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Sist. Bacteriol.* **41**:114-120.
- **Rodriguez-Navarro, D. N., J. E. Ruiz-Sainz, A. Buendía-Clavería, C. Santamaria, P. A. Balatti, H. B. Krishnan, and S. G. Pueppke.** 1996. Characterization of fast-growing rhizobia from nodulated soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in Vietnam. *Syst. Appl. Microbiol.* **9**:240-248.
- **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd. ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- **Scholla, M. H., and G. H. Elkan.** 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. System. Bacteriol.* **34**:484-486.
- **Selenska-Pobell, S., E. Evguenieva-Hackenberg, G. Radeva, and A. Squartini.** 1996. Characterization of *Rhizobium hedysari* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. *J. Appl. Bacteriol.* **80**:517-528.

- **Smith, G., J. W. Kijne, and B. J. J. Lugtenberg.** 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **171**:4054-4062.
- **Somasegaran, P., and H. J. Hoben.** 1994. Handbook for Rhizobia-Methods in legume *Rhizobium* technology, 450p. Springer Verlag, New York.
- **Stanley, J., and F. Cervantes.** 1991. Biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR 234. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:9-19.
- **Stowers, M. D., and A. R. Eaglesham.** 1984. Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Plant Soil* **77**:3-14.
- **van Berkum, P., D. Beyene, G. Bao, T. A. Campbell, and B. D. Eardly.** 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes indentified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with [*Medicago ruthenica* (L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:13-22.
- **van Rossum, D., F. P. Schuurmans, M. Gillis, A. Muyotcha, H. W. van Verseveld, A. H. Stouthamer, and F. C. Boogerd.** 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1599-1609.
- **Vargas, M. A. T., and A. R. Suhet.** 1980. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. *Pesq. Agropec. Bras.* **15**:343-347.
- **Vargas, M. A. T., and M. Hungria.** 1997. Fixação biológica do N_2 na cultura da soja, p.297-360. *In* M. A. T. Vargas, and M. Hungria (ed.), *Biologia dos Solos de Cerrados*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brazil.
- **Versalovic, J., T. Koeth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids. Res.* **19**:6823-6831.
- **Wang Beijing, E. T.** Agricultural University, Beijing, China.

- **Willems A., and M. D. Collins.** 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16s ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:305-313.
- **Xu, L. M., and C. Ge.** 1984. Physiological-biochemical characteristics and symbiotic responses of the fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Soyb. Sci.* **3**:102-109.
- **Yanagi, M., and K. Yamasato.** 1993. phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16s rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Letters* **107**:115-120.
- **Young, C. C., J. Y. Chang, and C. C. Chao.** 1988. Physiological and symbiotic characteristics of *Rhizobium fredii* isolated from subtropical-tropical soils. *Biol. Fert. Soils* **5**:350-354.
- **Young, J. P. W., H. L. Downer, and E. D. Early.** 1991. Phylogenic of the phototrophic rhizobium strain BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16s rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**:2271-2277.