

Artículo de investigación

Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos

Bernarda Cuadrado*, Guillermo Rubio, Winston Santos

Grupo de Investigación en Microbiología y Sistemas Simbióticos, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Cartagena.

* Correo electrónico: bernardac@yahoo.com

Recibido para evaluación: febrero 27 de 2009.

Aceptado para publicación: mayo 18 de 2009.

RESUMEN

Los suelos de Latinoamérica son ácidos y deficientes en nitrógeno; por esta razón es necesario explorar nuevas alternativas con el fin de modular el desarrollo de plantas, especialmente las leguminosas. El uso del potencial de las bacterias para inducir nodulación y fijar el nitrógeno en las plantas leguminosas se ha estudiado como una opción con potencial impacto. En este estudio se analizó la diversidad de cepas de rizobios aislados del frijol *Vigna unguiculata* (frijol caupí) cultivado en el norte del departamento de Bolívar (Colombia). Se identificaron aislados capaces de crecer mejor en ambientes hostiles (los cuales tienen un uso potencial como bioinoculantes). Se describe además un acercamiento a la taxonomía de estas bioespecies.

Se caracterizaron 52 cepas de rizobios (basados en sus características morfológicas, requerimientos de cultivo, metabólicas, resistencia a metales y antibióticos y de autenticación). De acuerdo con sus propiedades de crecimiento, el 63,5% fueron de cepas de lento, mientras que el 36,5%, de rápido crecimiento. Prevalcieron las de lento crecimiento con un 63,5% del total sobre un 36,5% de rápido crecimiento. Los aislados fueron caracterizados de acuerdo con sus patrones de asimilación de carbohidratos, y se encontraron microorganismos de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* (12 cepas identificadas como potenciales bioinoculantes).

Palabras clave: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Vigna unguiculata*, biodiversidad, bioinóculos.

SUMMARY

Characterization of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*'s strains (with ability of nodulation) selected from bean (*Vigna unguiculata*) cultures as a potentials bioinoculants

Latin America's soils are acidic and nitrogen-deficient, for this reason is necessary to explore new alternatives in order to modulate in the development of plants, specially the leguminous plants. The use of bacteria's potential to induce nodulation and to fix nitrogen in leguminous plants has been studied as an option with potential impact. In our study, we analyzed the diversity of rhizobial isolated of the bean *Vigna unguiculata* (beans cowpea) cultured in the north of Bolivar department (Colombia). We identified strains able of growing in hostile environment (which have a potential use like bioinoculants). Additionally, we described an approach to taxonomy of these biospecies.

We reached the characterization of 52 rhizobial strains (based on their morphologic, requires of culture, metabolic, resistance to metals and antibiotics and authentication characteristics). According with their growing properties, 63.5 % were slow growth strains while the 36.5 % were of rapid growth. The isolates were characterized according to their assimilation carbohydrate's pattern, finding microorganism as *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Mesorhizobium* (12 of which were identified as potential bioinoculants).

Key words: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Vigna unguiculata*, biodiversity, bioinoculants.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno se encuentra en la naturaleza fundamentalmente como gas (79% de la atmósfera), pero a pesar de su gran abundancia, de poco les sirve a las plantas y animales mientras permanezca en la atmósfera, ya que son incapaces de fijarlo y aprovecharlo; por fortuna, existen microorganismos que sí son capaces de fijar ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos fácilmente asimilables (1).

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Se estima que

este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno, o FBN, y esta simbiosis aporta una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos.

El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en agricultura ha ocasionado graves problemas de contaminación. No todo el fertilizante que se aplica es aprovechado por la planta, sino que una cuantía importante acaba en lagos y lagunas. La FBN es la opción natural de fertilización química.

Es marcado el interés que estas bacterias representan para la agricultura, que se emplean como inoculantes (biofertilizantes). Ejemplo de ello es el *Rhizobium*, que fue la primera bacteria producida a gran escala y se ha añadido como inoculante durante 105 años a diversos cultivos agrícolas, con éxito en muchos casos.

La carencia de equipos y tecnologías adecuadas para caracterizar y clasificar a los rizobios limitaron enormemente a los científicos en épocas pasadas; no obstante, parte de la información que se tiene acerca del fenotipo y genotipo de los rizobios descansa en los resultados de las investigaciones llevadas a cabo hace más de 60 años (2).

En la actualidad, la taxonomía de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otros aspectos, y no se pueden adelantar estudios de tipo genético si no se han identificado sus propiedades fenotípicas (3). Se estima que los rizobios no conocidos en el mundo representan un recurso biológico porque las leguminosas son uno de los grupos de plantas más grande y diverso y se encuentran distribuidas en distintos ecosistemas (4).

En la descripción del fenotipo de estas bacterias se reportan características morfológicas y de colonias, bioquímicas, fisiológicas, patrones de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y resistencia a antibióticos, entre otras. Estos datos se evalúan normalmente por un análisis de agrupamiento, la taxonomía numérica, lo cual puede ofrecer una visión detallada de la variación de las bacterias dentro de una especie o entre diferentes especies y reconocer rasgos característicos de cada especie (5).

Algunos rizobios tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otras y hay muchos problemas con este acercamiento, incluso el hecho de que existen cerca de 18.000 especies de legumbres e incontables tipos de rizobios. La “especificidad del anfitrión” de las bacterias y plantas prácticamente ha desaparecido, y un ejemplo es el caso particular de los rizobios aislados de *Vigna (V.) unguiculata*, en que la mayoría es capaz de nodular a todas las legumbres (6).

Son varias las especies de leguminosas comestibles que se siembran en Colombia; el área que ocupan se concentra principalmente en la Región Andina y valles interandinos. Colombia es el primer país productor de frijol en la Zona Andina, con alrededor de 130.000 hectáreas sembradas en 2007 y donde el primer lugar lo ocupa el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), con 133.720 hectáreas, mientras que en la Región Caribe, la importancia la tiene el frijol caupi (*Vigna sp*), con 4.600 hectáreas (7,8). Entre tanto, en el país se tiene que importar frijol, pues la demanda es más alta que la oferta, por lo que se está incentivando la siembra de esa leguminosa (9).

Los suelos de Latinoamérica se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno y tener, en términos generales, niveles bajos de fósforo y un pH ácido, lo cual, además de ser factores limitantes de la productividad de las plantas, afectarían el desarrollo de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* (10). En vista de esto, los científicos vislumbran la solución en el mejoramiento genotípico de las plantas y el fomento de microorganismos que favorezcan la eficiente utilización de nitrógeno y otros nutrientes.

En 1987, Rodríguez y Cerrato aislaron 120 cepas de *Rhizobium (R.) phaseoli* en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla. Éstas se caracterizaron por su morfología macro- y microscópica, además de sus propiedades bioquímicas. Los resultados que obtuvieron permitieron agrupar varias cepas con propiedades fisiológicas que se pusieron de manifiesto en invernadero y en campo (11).

En el verano de 1996, González caracterizó y calculó mediante dendograma los índices de similitud entre diferentes cepas de la familia *Rhizobiaceae* aisladas de plantas de caupi (*V. unguiculata*) en el departamento de Córdoba (Colombia). También caracterizó la cepa CIAT 4645, utilizada como control positivo del procedimiento. La pertenencia de las cepas a la familia *Rhizobiaceae* se comprobó amplificando por medio de la técnica de Reacción de la Polimerasa (PCR) un fragmento del gen *nif-H*; se encontró que de las 11 cepas aisladas analizadas, ocho de ellas y la cepa CIAT 4645 amplificaron un fragmento de 789 pb correspondientes al gen *nif-H*, lo cual comprueba la alta variabilidad existente dentro de las cepas aisladas de plantas de caupí de un mismo cultivo y confirma la “promiscuidad” de *V. unguiculata*, pues se observa que una misma planta se encuentra inoculada por cepas diferentes en nódulos distintos (12).

En 2000, Diouf y colaboradores obtuvieron 58 nuevas cepas aisladas de nódulos de raíces de frijol común cultivado en suelos originarios de diferentes áreas agroecológicas en Senegal y Gambia (este de África). Se usó un acercamiento polifásico que incluía técnicas genotípicas y fenotípicas para estudiar la diversidad de los diferentes *Rhizobium* aislados y determinar su relación taxonómica con especies de referencia (13).

En 2002, Martínez y García aislaron 28 cepas rizobianas nodulantes del fríjol caupí en suelos del departamento de Bolívar, en una relación de 1:3 entre la presencia de cepas de crecimiento rápido frente a las de crecimiento lento (14); Daguer y González en 2003 encontraron una relación de 1: 9 entre los aislamientos, y Rubio y Santos, 1: 7 (15), lo que habla de la gran diversidad existente según el lugar de muestreo.

Por otro lado, diversos factores pueden afectar la simbiosis impidiendo la aparición de nódulos y como consecuencia de ello la leguminosa puede morir, salvo que el suelo sea muy rico en derivados nitrogenados. Dentro de estos se encuentran: 1) factores químicos: concentración de cloruro de sodio, metales, temperatura, pH, niveles tóxicos de aluminio o manganeso y bajos niveles de calcio, magnesio, potasio y molibdeno (16); 2) factores físicos: la erosión, presencia de malezas, compactación, hidromorfismo, entre otros (17) y 3) factores biológicos: presencia de virus y bacterias que inhiben la nodulación, una de ellas el *Bdellovibrio* (18).

La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir los costos de la producción agrícola, cuidar el ambiente y por ende lograr un desarrollo sostenible obliga a estudiar la posibilidad de utilizar el potencial que tienen las bacterias que nodulan en las raíces de las leguminosas y en especial de las que se consideran no especializadas o promiscuas, de suerte que puedan utilizarse para inducir nodulación y fijar nitrógeno en otras leguminosas que pueden ser de mayor efectividad que el vigna y que se cultiven en las mismas regiones. El seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia en lugar de introducir cepas que aunque competitivas provienen de nódulos o suelos ajenos al sitio en cuestión y que por la determinante influencia que tiene la población de *Rhizobium* autóctono, el cual compite con las cepas introducidas y da lugar a un menor rendimiento (19, 20), indica que puede ser ventajoso a la hora de pensar en utilizar los rizobios aislados y propios como biofertilizantes. Esto constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos con vocación agrícola.

Por tanto, el objetivo de este estudio es analizar la diversidad de las cepas de rizobios aisladas del fríjol *V. unguiculata* (fríjol caupí), cultivado en el norte del departamento de Bolívar, tomando como base sus características morfológicas, de cultivo, metabólicas, resistencia a metales y antibióticos y de autenticación de cada microorganismo, como un paso previo a la identificación genotípica y de genes inductores de nodulación, e identificar cuáles de los aislados son capaces de crecer mejor en ambientes hostiles, hacer un acercamiento a la taxonomía y por ende concluir cuáles tienen potencial uso como bioinóculos.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Se recolectaron de forma aleatoria y representativa las raíces de 57 plantas de frijol *V. unguiculata*, en cultivos situados en los municipios de Santa Rosa, Villanueva, María la Baja y Turbana, en el departamento de Bolívar (Figura 1). La selección de los sitios de muestreo se realizó con ayuda de funcionarios de la *Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria* (UMATA) de los municipios seleccionados. Se identificó la especie hospedante (se recolectaron hojas, flores y semillas para la posterior identificación de la planta) con colaboración de agrónomos de Instituto Agropecuario Colombiano (ICA).

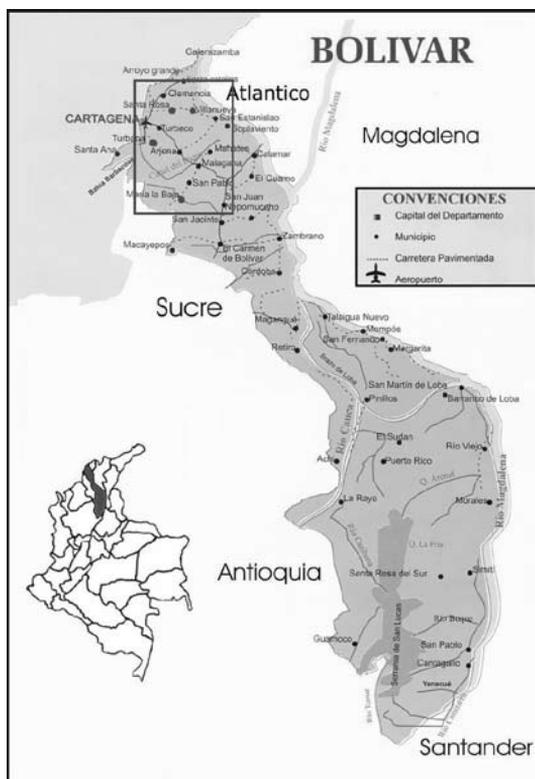


Figura 1. Mapa del departamento de Bolívar. En el recuadro están los cuatro lugares de recolección de las 57 muestras de raíces de frijol *Vigna unguiculata*: Santa Rosa (18), Villanueva (19), María la Baja (10) y Turbana (10), de donde se aisló un total de 52 cepas de rhizobios distribuidas así: 20 de Santa Rosa (39%), 15 de Villanueva (28%), 5 de María la Baja (10%) y 12 de Turbana (23%).

Toma de muestras

Con una espátula se describió una circunferencia en el terreno alrededor de la planta con un radio de 15 cm aproximadamente y se cavó en el contorno definido con una profundidad de 20 cm, levantando el bloque y removiendo la tierra de las raíces. De las raíces de cada planta se seleccionaron de 5 a 10 nódulos de buen aspecto y se eliminaron raicillas secundarias. Si la planta tenía semillas, éstas se recogían y almacenaban para utilizarse posteriormente en el proceso de autenticación.

La raíz seleccionada y despojada de raicillas secundarias se colocó en tubos con cloruro de calcio anhidro y se refrigeró hasta llegar al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, donde se procesaron y se codificaron según las iniciales del sitio de recolección y el número de la muestra.

Procesamiento de los nódulos

Para el procesamiento de las muestras se tuvieron en cuenta las técnicas descritas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (22) y Somesagaran (23).

Tras ser lavados, a los nódulos, se les verificó mediante un estudio macroscópico la actividad de la nitrogenasa, identificada como positiva al observar una coloración rojiza en su interior, que indica la producción de leghemoglobina (22).

Luego se procedió a realizar las pruebas de pureza a fin de descartar la presencia de contaminantes; la caracterización de las cepas y la autenticación para confirmar la inducción de nodulación y producción de nitrogenasa.

Los nódulos se maceraron y el producto obtenido se sembró en cajas petri con agar extracto de levadura-manitol o LMA con indicador rojo congo (LMA-RC) (levadura-manitol-agar: extracto de levadura: 1,5 g/L; manitol: 10,0 g/L; $MgSO_4$: 0,20 g/L; K_2HPO_4 : 0,50 g/L; NaCl: 0,20 g/L; $FeCl_3$: 1,00 mL/L; agar: 15,0 g/L). El rojo congo se añadió a razón de 10,0 mL/L de medio (pH 7).

Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 10 días, con observaciones diarias, descartando las cajas contaminadas y replicando las colonias típicas de rizobios en agar LMA-RC, hasta obtener cultivos uniformes y libres de impurezas. Las cepas aisladas se sometieron a las siguientes pruebas de pureza para descartar la presencia de posibles contaminantes (21):

- Coloración de Gram: las colonias seleccionadas debían estar formadas por bacterias Gram negativas y de tipo bacilar.
- Características de crecimiento en el agar peptona-glucosa o PGA: se sembraron los cultivos en medio PGA (peptona: 10,0 g/L, glucosa: 5,0 g/L, agar: 15,0 g/L,

púrpura de bromocresol 1,0% en etanol: 10,0 mL/L, pH: 6,7) y se incubaron a 28 °C por cinco días. El crecimiento acompañado con un cambio de pH indicaba la presencia de un contaminante, porque los rizobios no crecen en este medio.

- Producción de 3-ketolactosa en el agar levadura-lactosa o LLA (21): se sembraron los cultivos en medio LLA y se incubaron a 28 °C hasta lograr un buen crecimiento de las colonias. Luego se cubrieron las cajas con 15 mL de reactivo de Benedict por 10 minutos. La formación de un color amarillo después de este lapso indicaba presencia de *Agrobacterium sp*, un contaminante frecuente capaz de inducir la nodulación pero no de fijar el nitrógeno.
- Variación de pH en caldo extracto de levadura-manitol o LM: las cepas se sembraron en caldo LM por 15 días, al cabo de lo cual se midió el pH teniendo presente que un pH menor de 5,5 o mayor de 8 indicaba la presencia de microorganismos contaminantes.

Las cepas que pasaron las tres pruebas fueron posteriormente caracterizadas fenotípicamente y empleadas al mismo tiempo en el ensayo de autenticación.

Para la caracterización se sembraron en LMA-RC o el mismo medio pero modificado según el aspecto que se iba a evaluar. Las placas se incubaron a 28 °C por 15 días máximo y las colonias se clasificaron de acuerdo con su apariencia (forma, color, textura y tamaño), según las categorías sugeridas por Somasegaran (23).

Dentro de los parámetros evaluados estuvieron:

- La velocidad de crecimiento en medio LMA-RC (tiempo máximo de incubación: 15 días).
- La producción de acidez (o alcalinidad) en medio LMA con indicador azul de bromotimol o ABT.
- La tolerancia a cloruro de sodio al 1, 2 y 3%.
- Crecimiento a diferentes valores de pH: 4,0, 5,0 (con HCl 1N), 7,0 y 9,0 (con NaOH 0,5N).
- El crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas: 10, 36 y 40 °C.
- La resistencia al Zn^{+2} , Al^{3+} y Co^{+2} al 0,4%.
- Asimilación de diversas fuentes de carbono al 1%: maltosa, ramnosa, xilosa, galactosa, manosa, rafinosa, lactosa, fructosa, sucrosa, arabinosa, glucosa, sorbitol, sorbosa y dextrina.

- Resistencia intrínseca a antibióticos: sulfato de amikacina (3 ppm y 10 ppm), ciprofloxacina, ceftriazona, clindamicina, ampicilina, gentamicina y cloranfenicol.

Durante todos los ensayos, tanto de caracterización morfológica, fisiológica, bioquímica, de resistencia y de autenticación, se emplearon cinco cepas de referencia, tres de *Bradyrhizobium*, la CIAT 79, *Bradyrhizobium* 5625, *Bradyrhizobium* 5626 y dos de *Rhizobium*, la *R. tropici* 4654 y *R. leguminosarum* 9116.

Para el proceso de autenticación se eligieron al azar diez de las cepas purificadas que fueron sembradas por triplicado en tubos con medio LMA inclinado e incubadas a 28 °C hasta crecimiento. Al mismo tiempo, a semillas de frijol caupí recién cosechadas en los cuatro municipios del estudio se les sometió a un procedimiento de desinfección con etanol e hipoclorito de sodio, se trasladaron a cajas de petri con agar en agua al 0,75% hasta su germinación y de ahí a las jarras de Leonard con solución nutritiva de Sandman (22), en una cámara de fotoperíodo de 12 horas y a una temperatura de 25-30 °C. Al cabo de una semana se descartaron las plantas con crecimiento deficiente.

Las plantas se regaron con solución de Sandman (1:4) cada tres días, durante los cuales se hicieron observaciones para identificar la aparición de nódulos. Cinco semanas después del trasplante a las jarras se finalizó el ensayo y se registraron los resultados obtenidos acerca de cuáles de las cepas probadas fueron capaces de inducir nodulaciones; se anotó el color interior de los nódulos. Cada cepa se evaluó por triplicado.

Las cepas rizobianas ya caracterizadas y autenticadas se conservaron de acuerdo con el método de conservación en fragmentos en porcelana (22).

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se analizaron utilizando el *software* Stat Graphics Plus 5.1 bajo Windows, usando todas las características fenotípicas e incluyendo como variable principal la velocidad de crecimiento, que permite realizar una clasificación jerárquica. El método empleado fue el del “Vecino más Cercano”. Se asignó a cada una de las pruebas realizadas el número 0 en caso de que la respuesta fuera negativa (ausencia de crecimiento) y el número 1 cuando la respuesta fuese positiva (crecimiento normal). También se hicieron gráficas para el estudio de los porcentajes y tablas de distribución de frecuencias. Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se compararon con las bases de datos existentes y se hizo una aproximación a la clasificación taxonómica de género, y teniendo en cuenta la resistencia, se identificaron aquellas cepas con potencial uso como biofertilizantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 57 muestras recolectadas en los municipios de Villanueva, Santa Rosa, Turbana y María la Baja, se obtuvieron 77 nódulos de los cuales se aislaron 166 cepas bacterianas, que fueron sometidas a las pruebas de pureza. De esta suerte se logró un total de 52 cepas distribuidas de la siguiente forma: 15 de Villanueva (28%), 5 de María la Baja (10%), 12 de Turbana (23%) y 20 de Santa Rosa (39%).

El mayor porcentaje (39%) se encontró en el municipio de Santa Rosa, seguido por Villanueva (28%). Esta frecuencia podría deberse a mayor actividad de siembra de leguminosas, más exactamente de frijol caupí comparado con los otros municipios objeto de muestreo y posiblemente por la ausencia de iones de Al^{3+} y Co^{+2} (dato no mostrado), metales perjudiciales para el normal crecimiento de las plantas (23).

Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas rizobianas

Las cepas estudiadas presentaron características diversas en cuanto a tiempo de crecimiento, tamaño de las colonias, forma, textura y color, teniendo como parámetro las categorías de Somasegaran, al igual que la reacción en agar LMA-ABT (Tabla 1).

Con base en estos parámetros, de las 52 cepas, 19 (37%) fueron de crecimiento rápido (2 a 5 días), las cuales acidificaron el medio LM y produjeron colonias gomosas, muy suaves y acuosas, grandes, de 4 a 5 mm, translúcidas. Las 33 cepas restantes (63%) fueron rizobios de crecimiento lento (5-7 días), productores de alcalinidad en medio LMA, de colonias pequeñas (1mm), opacas en su gran mayoría y menos gomosas.

Alarcón y colaboradores (25) relacionaron el tiempo de crecimiento con el diámetro de las colonias y sus formas. Con esta base se concluye que las cepas aisladas pueden dividirse en dos grandes grupos que corresponderían, a su vez, a los descritos por Jordan (26): las de crecimiento rápido o grupo I, género *Rhizobium*, y las de crecimiento lento o grupo II, género *Bradyrhizobium*. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*, conocidos colectivamente como rizobios, son bacterias gramnegativas, fijadoras de nitrógeno, que forman nódulos en la planta anfitrión, pertenecen a diferentes familias dentro de la clase Alpha Rizobiales. El género *Mesorhizobium* (que significa intermediario entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) presenta crecimiento lento o moderado y producción de ácido (26); de igual forma, el género *Azorhizobium* crece tan rápido como *Rhizobium* y produce alcalinidad como *Bradyrhizobium* (27). De manera que ninguna de las 52 cepas estudiadas correspondería a los géneros *Mesorhizobium* o *Azorhizobium*.

Tabla 1. Caracterización morfológica, origen, velocidad de crecimiento y reacción en medio LMA-ABT de cepas nativas aisladas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*).

Código cepa	Origen	Velocidad de crecimiento	Morfología	Reacción	Grupo (Género)
1AMR1	VN	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
2ACR5	VN	2 días	c, t, go, g	Ácida	I
4ACR2(2)	VN	6 días	li, t, go, g	Alcalina	II
5AMR2	VN	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
5ACR3	VN	7 días	li, o, f, p	Alcalina	II
7AMR2	VN	7 días	Li, o, f, p	Alcalina	II
7ACR2	VN	7 días	li, o, f, p	Alcalina	II
1FCR4(2)	VN	2 días	c, t, go, p	Ácida	I
2FCR4	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
4FMR3	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
4FCR3	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
6FMR3	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
6FCR4	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
8FMR4	VN	2 días	c, t, go, p	Ácida	I
8FCR4	VN	2 días	c, t, go, p	Ácida	I
1BMR2	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
2BMR3(2)	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
3BMR3	ST	2 días	c, t, go, g	Ácida	I
5BCR4	ST	2 días	c, t, go, g	Ácida	I
6BCR2(1)	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
7BMR2	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
7BCR3(3)	ST	7 días	li, o, f, p	Alcalina	II
8BCR4	ST	2 días	c, t, go, g	Ácida	I
9BCR2	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
10BMR2	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
10BCR3	ST	7 días	li, o, f, p	Alcalina	II
11BMR2	ST	6 días	li, o, f, p	Alcalina	II
12BMR2	ST	7 días	li, o, f, p	Alcalina	II
12BCR2	ST	2 días	li, t, a, g	Ácida	I
1CCR1	TU	7 días	c, b, p, f, o	Alcalina	II
3CMR2	TU	8 días	c, b, p, f, o	Alcalina	II
4CMR1	TU	8 días	c, b, p, f, o	Alcalina	II
4CCR1	TU	8 días	c, b, p, f, o	Alcalina	II
5CMR1	TU	8 días	ch, b, p, f, o	Alcalina	II
6CMR2	TU	8 días	c, b, p, f, o	Alcalina	II
7CMR1	TU	8 días	c, b, p, f, o	Alcalina	II
7CCR1	TU	8 días	c, b, p, go, o	Alcalina	II

(Continúa...)

Tabla 1. Caracterización morfológica, origen, velocidad de crecimiento y reacción en medio LMA-ABT de cepas nativas aisladas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) (Continuación...).

Código cepa	Origen	Velocidad de crecimiento	Morfología	Reacción	Grupo (Género)
9CMR1	TU	7 días	ch, r, p, s	Alcalina	II
9CCR1	TU	5 días	c, b, p, f, o	Ácida	I
10CMR2	TU	8 días	li, r, p, go, t	Alcalina	II
10CCR1	TU	8 días	ch, r, p, f, o	Alcalina	II
2DMR1	MB	8 días	c, r, p, f, o	Alcalina	II
4DCR1	MB	8 días	ch, b, p, f, o	Alcalina	II
5DMR1	MB	2 días	ch, le, p, go, o	Ácida	I
6DCR1	MB	8 días	ch, b, p, f, o	Alcalina	II
9DMR2	MB	8 días	ch, le, p, f, o	Alcalina	II
1EMR3	SR (II)	8 días	li, o, f, p	Alcalina	II
1ECR3	SR (II)	8 días	c, t, go, p	Alcalina	II
7EMR5	SR (II)	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
7ECR5	SR (II)	2 días	li, t, go, p	Ácida	I
8EMR4	SR (II)	3 días	li, o, f, p	Ácida	I
8ECR4	SR (II)	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
1FCR4(2)	VN	2 días	c, t, go, p	Ácida	I
2FCR4	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
4FMR3	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
4FCR3	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
6FMR3	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
6FCR4	VN	2 días	li, o, f, p	Ácida	I
8FMR4	VN	2 días	c, t, go, p	Ácida	I
8FCR4	VN	2 días	c, t, go, p	Ácida	I
CIAT 79	REF	9 días	ch, ro, p, s	Alcalina	II
<i>R. tropici</i> 4654	REF	2 días	ch, le, p, go	Ácida	I
<i>Bradyrhizobium</i> 5625	REF	8 días	ch, b, p, go, o	Alcalina	II
<i>Bradyrhizobium</i> 5626	REF	8 días	ch, le, p, go, o	Alcalina	II
<i>R. leguminosarum</i> 9116	REF	5 días	ch, le, p, go	Alcalina	II

VN: Villanueva

ST: Santa Rosa

TU: Turbana

MB: María la Baja

REF: cepas usadas como referencia

c: cúpula, li: lisa o llana, o: opaca, t: translúcida, f: firme poco gomosa, go: gomosa muy suave, a: acuosa, p: pequeña, g: grande

Se indica el código de la cepa y la procedencia de cada una de los aislados, junto con la velocidad de crecimiento (en días), la morfología de las colonias, reacción ácida o alcalina en medio LMA y el género al cual se postula pertenecen: crecimiento rápido: grupo I o *Rhizobium* y crecimiento lento: grupo II o *Bradyrhizobium*. Se incluyen cepas de referencia con fines de comparación.

El frijol caupí está incluido en el grupo de leguminosas, que según Somasegaran (23) y Thies (28) puede ser nodulado en su mayor parte por rizobios de crecimiento lento, lo cual es confirmado en este estudio. Además, se observó en 12 casos crecimiento de dos tipos diferentes de rizobios y el fenómeno considerado “dimorfismo” (22), lo que indica que una misma planta puede ser infectada por cepas con características diferentes no sólo desde el punto de vista morfológico, sino también fisiológico y genético (29), sin que importe la zona de muestreo. De los 12 casos, el 50% (6 casos) se dio en los aislados del municipio de Santa Rosa y todos ellos correspondientes a cepas de crecimiento lento. Sólo se presentó un caso en que ambas cepas eran de crecimiento rápido y otro de crecimiento lento y rápido en un mismo nódulo.

Caracterización fisiológica y bioquímica

Tolerancia a concentraciones del 1 y 2% de NaCl

Del total de aislamientos, se encontró que 11 (21%) no crecieron a ninguna concentración de NaCl, 10 de ellos eran de crecimiento lento y procedían del municipio de Villanueva. Sólo toleraron 1% de NaCl ocho casos (15%), de los cuales siete correspondían a cepas de crecimiento rápido. Sólo 20 aislados toleraron 3% de NaCl (38%) y de éstos, 18 eran de crecimiento lento, la mayoría provenientes de Santa Rosa. Sólo seis cepas pudieron crecer en el rango entre 1 a 3% y pertenecían al grupo de crecimiento rápido.

Se observa que a medida que aumenta la concentración de NaCl, las de crecimiento lento lo toleran más que las de crecimiento rápido. Lo cual concuerda con los resultados de Matos-Cuzcano (31) y Barboza (32), pero no con lo expresado por Jordan (26). Barboza y colaboradores (32) muestran en su estudio que algunas cepas de *Bradyrhizobium sp* pueden tolerar concentraciones del 1,5% de NaCl; al contrario, Jordan (26) señala que las cepas de crecimiento lento, miembros del género *Bradyrhizobium*, no pueden crecer al 2% de NaCl.

En los suelos de los municipios de Turbana y María la Baja se encontraron concentraciones de sodio del orden de 0,042 y 0,047% (dato no mostrado), hecho que pone de manifiesto que la resistencia de las cepas al cloruro de sodio es independiente de la concentración de sodio en los suelos, ya que en ambos sitios se lograron aislados que toleran altas concentraciones.

Mpepereki y colaboradores (33) aislaron cepas de *Rhizobium* de *V. unguiculata* tolerantes a concentraciones por encima de 5,5% de NaCl, y Ghittoni y Bueno (34), rizobios de rápido crecimiento más tolerantes que los de lento crecimiento; en otras palabras: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* han demostrado marcada variación en la tolerancia a la sal, ya que mientras algunos han sido inhibidos por concentraciones de 100 mM (0,6%) de NaCl (34), otros como *R. meliloti* muestran tolerancia en un rango de 300 (1,8%) a 700 mM (4,2%) de NaCl (35).

La presencia de sal puede afectar el crecimiento y la supervivencia de *Rizobium* en el suelo, disminuyendo la colonización de la raíz, el proceso de infección y con ello el desarrollo del nódulo y el funcionamiento activo de éste en la fijación de nitrógeno (37). Por tanto, es conveniente estudiar los suelos de estas regiones con el fin de evaluar si la capacidad de resistencia al NaCl se relaciona directamente con un tipo de adaptación. En todo caso, las cepas con tolerancia a concentraciones altas de NaCl podrían tener un posible uso como bioinóculos.

Tolerancia a diferentes valores de pH (4, 5 y 9)

Hubo mucha diversidad en los aislamientos, pues se encontró que predominantemente las cepas de crecimiento lento fueron capaces de crecer en los cuatro pH utilizados, en contraposición con lo que Jordan (26) señala, que usualmente las cepas del género *Bradyrhizobium* no crecen a pH 9.

Todas las cepas que toleraron pH 7 a 9 pertenecían al grupo de las de crecimiento rápido, la mayoría del municipio de Villanueva. Dentro del grupo de rizobios de crecimiento rápido, las únicas que pudieron crecer en los cuatro niveles de pH evaluados la 5DMR1 de María la Baja y la 5BMR4 y 8BCR4 de Santa Rosa; estas dos crecieron a concentraciones de 1 y 2% de NaCl, por lo que serían de mucho interés como potenciales bioinóculos.

En Bolívar se encuentran especies de frijol sembradas en su mayoría en zonas de pendiente fuerte a escarpada, con suelos generalmente ácidos y de bajo contenido en fósforo (8), lo que concuerda con los valores de pH de 5,24 y 6,85 encontrados en Turbana y María la Baja (14).

Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 36 y 40 °C)

Del total de 52 cepas estudiadas, se observó que 19 (37%) crecieron ampliamente en el rango de las tres temperaturas evaluadas y 27 (51%) toleraron temperaturas de 35 y 40 °C; además, 5 cepas (9,5%) crecieron sólo a 35 °C.

El hecho de que las cepas en términos generales presentaran un buen crecimiento a 35 y 40 °C puede atribuirse al clima tropical de las zonas de donde fueron aisladas, que tienen características mesofílicas; la temperatura de los suelos de Bolívar oscila alrededor de 35 °C, condición que las hace útiles como posibles bioinóculos.

Los datos expuestos en este estudio mediante este factor condicionante están de acuerdo con Osa-Afiana y Alexander (38), que encontraron que la temperatura máxima de crecimiento para los rizobios de zonas tropicales es de 42 °C. Además, Munévar (24) concluye que las cepas de rizobios son capaces de crecer a temperaturas de entre 27 y 45 °C, lo cual coincide con lo que se encontró en este estudio.

Resistencia a Zn^{+2} , Al^{+2} y Co^{+2}

Del total de 52 cepas estudiadas, 41 (79%) presentaron algún tipo de tolerancia a los metales utilizados; de éstas, 17 son de rápido crecimiento, y 24, de lento. Santa Rosa tuvo el mayor número (41%) de cepas tolerantes seguida por Villanueva (32%).

Del total de aislados tolerantes, el 83% resistieron los tres metales empleados. Tong y Sadowsky (39) y Somasegaran (23) indican que las cepas del género *Bradyrhizobium* son tolerantes a la presencia de 4mg/L de Zn^{+2} y Co^{+2} . Los mismos autores encontraron que ninguna de las seis especies de *Rhizobium* ensayadas pudo crecer en presencia de estos metales, dato que es contrario a lo observado en este estudio, el cual encontró que las cepas de crecimiento rápido (posiblemente *Rhizobium*) toleraron la presencia de estos metales.

De los tres metales evaluados, la tolerancia al aluminio es una característica realmente deseable para la selección de un bioinóculo principalmente en suelos ácidos, donde éste suele acumularse. El Al^{+2} es un metal tóxico y el primer indicio de su existencia es el descenso del crecimiento en longitud de las raíces. El Al^{+2} puede actuar inhibiendo el alargamiento y la división celulares (35).

En suelos ácidos con pH de 5,0, donde la presencia de metales es relevante, la presencia de Al^{+2} inhibe también la nodulación; se han encontrado cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que fueron resistentes a Al^{+2} 50mM a bajos pH (5,0) (35). Johnson y Wood (40) reportaron que el Al^{+2} se enlaza al DNA de cepas sensibles y tolerantes de rizobios, pero la síntesis de DNA no se afecta en las cepas tolerantes de *R. loti*; entre tanto, Richardson y colaboradores (41) encontraron que 7,5 mM de Al^{+2} reprimen la expresión del gen *nod*.

Selección de potenciales bioinóculos

Los criterios básicos que hay que considerar en el proceso de selección son la capacidad para formar nódulos (infectividad), fijar nitrógeno (efectividad), sobrevivencia en las semillas y en el suelo, adaptación o tolerancia a situaciones de estrés y estabilidad genética. También es fundamental la capacidad de crecimiento en las condiciones de producción de los inoculantes (41).

Teniendo en cuenta que uno de los puntos para selección de cepas de rizobios con potencial uso como inoculante es su capacidad para tolerar condiciones de estrés, se seleccionaron las cepas que presentaron resistencia a los factores estudiados (NaCl, pH, metales Zn^{+2} , Al^{+2} y Co^{+2} y temperatura).

De esta forma 16 cepas se seleccionaron por tener algún grado de tolerancia a NaCl al 1, 2 y 3%. Estudios de suelos realizados por González y Cortés (43) en la zona del Canal del Dique (norte de Bolívar) municipios de Arjona, Calamar, Mahates, María la Baja,

San Estanislao, Santa Rosa, Soplaviento, Turbaco, Turbana y Villanueva, muestran un promedio de 3,78 meq de sodio por cada 100 gramos de muestra, lo cual equivaldría a sólo un 0,22% de NaCl; incluso valores hallados de 12,5 meq sólo representarían un 0,7%. Por ende, estas cepas sobrepasan las expectativas.

De igual forma, se preseleccionaron individualmente las cepas más tolerantes en cada factor; se identificaron 38 cepas con buena respuesta a valores de pH ácidos (4 y 5) y 39 que toleraron concentraciones de 4 ppm de Zn^{+2} , Al^{+2} y Co^{+2} . Los estudios de González y Cortés muestran un perfil ácido de los suelos del norte de Bolívar con valores que oscilan alrededor de las 6,12 unidades de pH, incluso alcanzando valores cercanos a 4,5 en algunos sectores y concentraciones de Al^{+2} que van de 0,1 a 2,86 ppm. Éste es el más tóxico de los metales empleados y, por tanto, el más influyente para la selección de las cepas. En cuanto a la temperatura, 98% de las cepas se desarrollaron bien a las temperaturas propias del departamento.

En total de las 52 cepas, 12 pueden tolerar al menos tres de los cuatro factores evaluados y sólo cuatro cepas 2ACR5, 8BCR4, 8ECR4 y 8EMR4 toleraron los cuatro factores (Tabla 2) y se han preseleccionado como potenciales inoculantes.

Tabla 2. Cepas rhizobianas de mejor perfil para ser empleadas como potenciales bioinóculos.

Cepas	Velocidad	Origen	NaCl	Temperatura	Al^{+2}	pH
2ACR5	2 días	VN	+	+	+	+
3BMR3	2 días	SR	+	+	-	+
8BCR4	2 días	SR	+	+	+	+
12BCR2	2 días	SR	+	+	-	+
1ECR3	8 días	SR	+	-	+	+
7ECR5	2 días	SR	+	+	+	-
8ECR4	2 días	SR	+	+	+	+
8EMR4	3 días	SR	+	+	+	+
4FMR3	2 días	VN	+	+	+	-
6FCR4	2 días	VN	+	+	+	-
8FMR4	2 días	VN	+	+	+	-
1FCR4(2)	2 días	VN	+	+	+	-

VN: Villanueva
 SR: Santa Rosa
 +: Crecimiento
 -: No crecimiento

Se seleccionaron basados en su resistencia a condiciones hostiles: concentración de NaCl superior al 1%, temperatura, Al^{+2} y pH ácidos. Los aislados tienen su origen en los municipios de Villanueva y Santa Rosa.

Diversidad genética: asimilación de diferentes fuentes de carbono y resistencia intrínseca a los antibióticos

Asimilación de fuentes de carbono

Se ha demostrado la habilidad de las bacterias del género *Rhizobium* para asimilar una gama de carbohidratos mayor a la del género *Bradyrhizobium*, por lo cual esta propiedad se considera de alta significancia taxonómica, en particular para este grupo (22).

Existe una gran diversidad entre los patrones de asimilación, escogiéndose entre los más usados la sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol y dextrina, y los menos usados (y a su vez los más discriminantes) xilosa, arabinosa y sorbosa.

Todos los aislados de Villanueva, independientemente de que fueran de crecimiento lento o rápido, asimilaron glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa, excepto ramnosa, lo que indica que posiblemente se trate de dos cepas que difieren principalmente en la velocidad de crecimiento. En el resto de los sitios de muestreo se observó mayor diversidad.

Mediante un dendograma (Figura 2), el total de los aislados se separó en cinco grupos que se diferencian en el patrón de asimilación de ciertos carbohidratos, en particular de ramnosa, fructosa, xilosa y galactosa, que permiten hacer un acercamiento taxonómico. Frente a este comportamiento, se podría concluir que existen desde este punto al menos cinco cepas diferentes, dos de crecimiento rápido y tres de crecimiento lento.

Al parecer las cepas aisladas y de crecimiento lento pertenecen al género *Bradyrhizobium*; dentro de éstas, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. liagningense* y *B. yuanmingense*, y al género *Mesorhizobium*, *M. ciceri* y *M. mediterraneum*, *M. amorphae*, *M. chacoense* y *M. huakuii*, y las de crecimiento rápido, a *Rhizobium* (*R. etli* y *R. indigoferae*) (43, 44), lo que debe ser confirmado por estudios genéticos.

Resistencia intrínseca a los antibióticos

La identificación y selección de cepas más eficientes de rizobios se ha llevado a cabo utilizando diferentes metodologías; dentro de éstas, la resistencia intrínseca a antibióticos es útil por su fiabilidad a bajos niveles de antibiótico, estabilidad y reproducibilidad durante un largo período (45).

Generalmente para evaluar la resistencia intrínseca a antibióticos se emplean medios de cultivo a los cuales les han adicionado antibióticos puros, mientras en otros casos los antibióticos pueden utilizarse en discos (10, 24). En este estudio se usaron antibióticos comerciales, como lo hicieron Xavier y colaboradores (47), con el fin de observar la diversidad de los rizobios.

Aunque la variación en la resistencia de cepa a cepa puede ser notable, en general, los rizobios de crecimiento rápido son intrínsecamente más sensibles que los de crecimiento lento a estreptomycin (25), contrario a lo hallado en este trabajo, en el cual las cepas de crecimiento rápido fueron más resistentes a las concentraciones de estreptomycin que las cepas de crecimiento lento.

En las cepas de crecimiento rápido resistentes a estreptomycin se encontró alta sensibilidad a la concentración de 500 ppm de ampicilina, pero alta resistencia a 500 ppm de cloranfenicol. Xavier y colaboradores (47) describen rizobios nodulantes de frijol caupí aislados en zonas tropicales del noreste brasileño, sensibles a 500 ppm de ampicilina, pero al contrario de lo hallado aquí, sensibles a 500 ppm de cloranfenicol.

La gentamicina indujo el mayor porcentaje de resistencia (77%) en los aislados, mientras que la ampicilina obtuvo el menor (20%). La amikacina a 10 ppm no fue tolerada por cepas de lento crecimiento, mientras que a 3 ppm sólo cinco de las 25 cepas resistentes lo eran. El ser resistentes a estos dos antibióticos les confiere una ventaja a las cepas de rápido crecimiento sobre las de lento crecimiento, esto es, tener amplio espectro de tolerancia.

Autenticación

De las 52 cepas obtenidas como resultado de las pruebas de purificación se eligieron 20 al azar para la prueba de autenticación, con el fin de comprobar su capacidad de inducir la formación de nódulos en la raíz de la planta hospedera, según lo recomendado por el CIAT (22). Esta prueba se realizó por triplicado.

Las plantas inoculadas en jarras de Leonard se mantuvieron por un lapso de 45 días en las condiciones adecuadas en el laboratorio, al término del cual se observó la presencia de nódulos en las raíces y una coloración rosada a roja dentro de éstos, lo que evidenció la presencia de leghemoglobina y por ende una activa fijación de nitrógeno. Los testigos con nitrógeno o sin él no presentaron nodulación. El máximo de nódulos encontrados en cada planta fue de 3, la mayoría en las raíces principales.

Análisis numérico

Al incluir características tales como crecimiento en NaCl al 1%, pH 4 y 5, velocidad de crecimiento, temperatura de crecimiento de 35 °C, resistencia a Zn^{+2} , Al^{+2} y Co^{+2} , asimilación de xilosa, fructosa y sorbosa y resistencia intrínseca a antibióticos como amikacina (10 ppm) y ampicilina, fue posible hacer un análisis general de la situación de diversidad de las cepas aisladas, por medio de la elaboración de un dendograma (Figura 2).

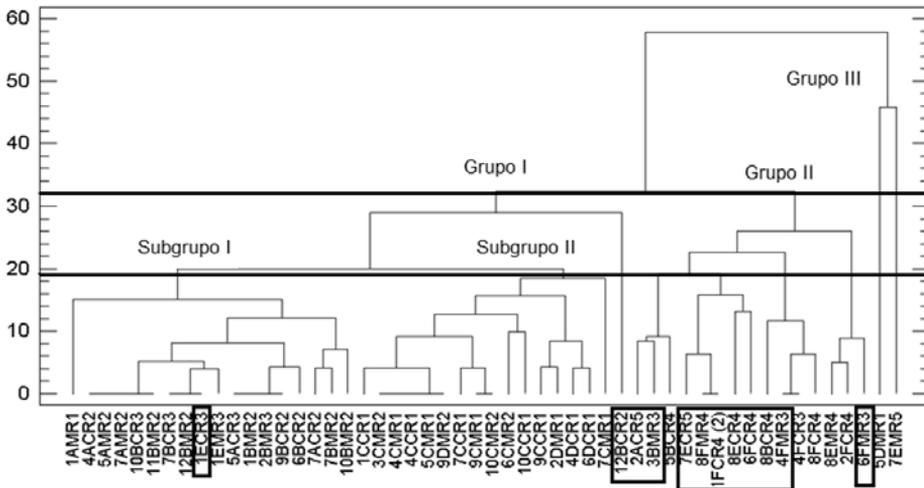


Figura 2. Dendrograma general de los aislados de los nódulos de frijón *V. unguiculata*. Se utilizaron todas las características fenotípicas con la velocidad de crecimiento como variable principal. El método empleado fue el del Vecino más Cercano. A una distancia 32, se dividen en tres grupos, así: grupo I, velocidad de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*); grupo II, crecimiento rápido (*Rhizobium*); y grupo III, con crecimiento moderado. A una distancia 19, el grupo I se divide en tres subgrupos que difieren en su perfil de asimilación de carbohidratos y resistencia a factores hostiles. En recuadro se encuentran las cepas con potencial uso como bioinoculantes, de los cuales la 1ECR3 pertenece al grupo de crecimiento lento.

En el dendrograma a una distancia de 32, se traza una línea horizontal y se observan 3 grupos bien definidos en los cuales se establece la diferencia según la velocidad de crecimiento: grupo 1, de crecimiento lento; grupo 2, de crecimiento rápido; y grupo 3, dos cepas de crecimiento intermedio. El grupo 1, a su vez, a una distancia de 19, se divide en dos: el subgrupo 1, constituido por aquellas cepas de crecimiento lento, que no asimilan los carbohidratos: xilosa, fructosa y sorbosa; no toleran los antibióticos: amikacina (10 ppm) y ampicilina; capaces de crecer a pH muy ácidos (4 y 5), no toleran concentraciones de NaCl superiores a 1% y resistencia a todos los metales a los que fueron expuestos. La cepa (1AMR1) tiene un comportamiento ligeramente distinto de las demás, ya que tiene la cualidad de tolerar concentraciones de NaCl 1% y aún superiores. Y el subgrupo 2, que está constituido por cepas que presentan asimilación a carbohidratos, tales como xilosa y fructosa, y posiblemente se trate de *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, por el patrón de asimilación de los carbohidratos que se describió al

comienzo. Este grupo se caracteriza por presentar resistencia intrínseca a ampicilina. Aquí están cinco cepas de interés (9CCR1, 2DMR1, 4DCR1, 6DCR1 y 7CMR1).

El grupo 2, compuesto de las cepas de rápido crecimiento, presenta las siguientes características: tolerancia a concentraciones de NaCl 1% y mayores; poco o nulo crecimiento a pH muy ácido; tolerancia a los metales (Zn^{+2} , Al^{+2} y Co^{+2}); asimilación de fructosa y resistencia intrínseca a amikacina (10 ppm) y ampicilina. Gracias a que las cepas son de rápido crecimiento, su tolerancia a condiciones de acidez muy drásticas les representa un factor estresante prácticamente insuperable; de la misma manera, sólo cuatro cepas de este grupo asimilan correctamente al carbohidrato sorbosa (8BCR4, 4FMR3, 4FCR3, 8FCR4).

Por último, se observa un grupo pequeño conformado por dos cepas (5DMR1 y 7EMR5), que tienen características muy propias que no les permiten ser clasificadas entre las demás, ya que aun cuando la cepa 5DMR1 asimile xilosa y fructosa y además resista a la ampicilina, no está clasificada en el subgrupo 2, por su velocidad de crecimiento. La cepa 7EMR5 tiene las características como para estar categorizada con el grupo 2, pero por su resistencia a los metales no es posible incluirla en él. Estas dos cepas están en el mismo grupo porque comparten características tales como velocidad de crecimiento intermedio, tolerancia a NaCl 1%, a los tres metales empleados en el estudio y asimilación del carbohidrato fructosa.

Se pudo apreciar que aislamientos pertenecientes a diferentes sitios geográficos de muestreo presentaron características muy similares, incluso idénticas en especial en las cepas de crecimiento rápido. Con todo, se puede deducir que las bacterias de crecimiento rápido, si bien son un grupo pequeño, no dejan de tener variabilidad en su interior, lo cual no sucede en las de crecimiento lento.

Finalmente, según los resultados observados en el dendograma (Figura 2), cepas que discrepan solamente en algunas de las pruebas se consideraron parte de un mismo conglomerado; por tanto, resulta indispensable confirmar estas diferencias con pruebas genéticas, para así asegurar una posición taxonómica más estricta, es decir, que se puedan enunciar especies dentro de cada género.

CONCLUSIONES

El número de grupos establecidos de acuerdo con los patrones de crecimiento en las pruebas de tolerancia a salinidad, metales, temperaturas y pH ácidos y alcalinos funcionó como un indicador de la biodiversidad de las cepas. El factor que más discriminó fue el crecimiento en NaCl, en el que se establecieron siete grupos de distinto compor-

tamiento; por el contrario, del crecimiento a pH variados, sólo se establecieron tres grupos. El sitio de muestreo con mayor biodiversidad fue Villanueva y en especial el corregimiento de Zipacoa (dato no mostrado), ya que las cepas de este sitio estuvieron formando parte de 12 grupos del total de 20 establecidos, seguido de Santa Rosa, con 11 grupos. Turbana sólo formó parte de ocho grupos.

Según las características morfológicas, velocidad de crecimiento y producción de acidez y alcalinidad, se encontró que con mayor probabilidad las cepas de rizobios que nodulan *V. unguiculata* en el norte de Bolívar pueden pertenecer a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*; sin embargo, evidencias de la utilización de carbohidratos nos indican la posible existencia de *Mesorhizobium*. Este género, como su nombre lo indica, crece en un rango intermedio entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

En general, la relación encontrada fue 65,5% de cepas de lento crecimiento (*Bradyrhizobium*) y un 35,5% de rápido crecimiento (*Rhizobium*). Por sitio de muestreo sólo en Villanueva (Zipacoa) y Santa Rosa (Tabacal) se encontró el porcentaje de cepas de rápido crecimiento 100% y 66,6% respectivamente, mientras que en los demás sitios (Santa Rosa y María la Baja), los porcentajes de *Rhizobium* fueron inferiores a 28%.

Se encontró que pueden existir cepas distintas provenientes del mismo nódulo, lo cual evidencia cierto grado de promiscuidad de *V. unguiculata* que le otorgaría ventaja sobre otras especies de leguminosas, ya que si bien los mayores esfuerzos para potenciar la simbiosis se han centrado en las bacterias, la mejora de la simbiosis se obtendrá por la manipulación de la planta hospedera, de tal forma que se inhiban los mecanismos de defensa que limitan la nodulación de distintas especies de rizobios.

Pruebas de crecimiento en diversos rangos de NaCl, pH y temperatura demostraron ser de gran importancia para el estudio del papel ecológico y la interacción de los rizobios con el ecosistema; sin embargo, no son concluyentes para identificar géneros de rizobios y sólo son útiles para esbozar la diversidad genética de estas bacterias.

Según Martínez-Viera (48) y Fernández y Novo (49), los rizobios pueden crecer en un rango de temperatura de 20 a 31 °C. Así mismo, Hamdi (50) y Jordan (26) sitúan a los bradyrhizobios entre los menos tolerantes a la alcalinidad; sin embargo, Bécquer (3) caracterizó cepas de *Bradyrhizobium* sp, que crecieron a 40 °C y toleraron pH de 11, lo cual demuestra la amplia diversidad genética de estas bacterias y corrobora resultados obtenidos en este estudio. De modo general, las cepas de crecimiento rápido exhibieron mejores cualidades de tolerancia a factores estresantes, especialmente en pruebas como resistencia intrínseca a antibióticos y temperatura que las de crecimiento lento.

Es muy difícil identificar especies de *Rhizobium* basados únicamente en pruebas de caracterización fisiológica, bioquímica y morfológica; más aún cuando diversos autores como Lloret y Martínez-Romero (51) consideran que los plásmidos pueden transferirse de un género a otro, tanto en condiciones de laboratorio como en el campo, y existen referencias de una transferencia lateral de marcadores cromosómicos en *Rhizobium*.

Se debe prestar especial atención a todas las cepas aisladas que presentaron tolerancia a los factores de estrés a las que fueron sometidas. Está comprobado que sus características fisiológicas se diferencian notablemente de aquellos que son aislados de zonas agrícolas con condiciones edafoclimáticas más nobles. Esas características resultantes de mutaciones en el genoma pueden y deben ser explotadas en la práctica agrícola. En este estudio se tuvieron en cuenta la tolerancia a estrés salino, de metales, temperaturas y pH, además de características de resistencia a antimicrobianos; sin embargo, es importante realizar autenticaciones en condiciones de campo para verificar el tamaño de nódulos, su localización en la raíz y la sobrevivencia del inoculo en la semilla.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Cartagena, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por facilitar los equipos, personal e instalaciones para el desarrollo de este trabajo. De igual forma, a los profesionales del ICA en la identificación de las plantas y de las UMATAS de los municipios, en el acompañamiento para la realización de los diferentes muestreos.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. P. Russelle y A. S. Birr, Biological nitrogen fixation. Large-scale assessment of symbiotic dinitrogen fixation by crops: Soybean and alfalfa in the Mississippi river basin, *J. Agron.*, **96**, 1754 (2004).
2. P. A. Dangeard, Recherches sur les tubercles radicaux des legumineuses, *Botaniste*, **16**, 1 (1926).
3. C. J. Bécquer, “Diversidad genética y posición taxonómica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras nativas en Sancti-Spíritus, Cuba”, Tesis de Maestría, Universidad de La Habana, 1998.
4. C. J. Bécquer, Descripción y clasificación de rizobios: Enfoque histórico, métodos y tendencias actuales, *Revista Biología*, **18**, 9 (2004).

5. C. J. Bécquer, “Caracterización y selección de rizobios aislados de leguminosas nativas de Sancti-Spíritus, Cuba”, Tesis de Doctorado, Universidad de La Habana, 2002.
6. W. Broughton, Roses by Other Names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*, *J. Bacteriol.*, **185**, 2975 (2003).
7. Departamento Nacional de Planeación. República de Colombia. Anuario Estadístico del Sector Agropecuario-Min Agricultura. URL: <http://www.dnp.gov.co/PortalWeb/Portals/0/archivos/documentos/DDRS/Indicadores/Tabla%201.pdf>, junio 2009.
8. Departamento Nacional de Planeación. Anuario estadístico del sector Agropecuario-Min-Agricultura. URL: <http://www.dnp.gov.co/PortalWeb/Default.aspx>, agosto, 2009.
9. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. Políticas y programas misionales. Apoyos y económicos y financiamiento: Incentivos al frijol. URL: http://www.minagricultura.gov.co/07presupuesto/07a_gin_frijol.aspx, junio 2009.
10. H. W. Fassbender y E. Bornemisza, “Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina”, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Eds., San José, 1994, p. 420.
11. M. N. Rodríguez-Mendoza y R. Ferrera-Cerrato, Estudio microbiológico de un grupo de cepas de *Rhizobium phaseoli* aislados en la meseta central (México), *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **29**, 91 (1987).
12. D. S. González, “Caracterización mediante marcadores moleculares de cepas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que maximicen la fijación simbiótica de nitrógeno con caupí (*Vigna unguiculata*)”, Tesis de Grado, Ingeniería Agrónoma, Universidad Pública de Navarra, 1997.
13. D. P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kersters, M. Gillis, E. Martínez-Romero y M. Gueye, Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 159 (2000).
14. K. Martínez y J. García, “Estudio de la diversidad de la cepas rizobianas nodulantes del frijol caupí en los municipios de Villanueva y Santa Rosa en el depar-

- tamento de Bolívar”, Tesis de Grado, Química Farmacéutica, Universidad de Cartagena, 2002.
15. N. Daguer y Th. González, “Diversidad de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que nodulan al frijol caupí (*Vigna unguiculata*) y autenticación utilizando bolsas de crecimiento y jarras de Leonard”, Tesis de Grado, Química Farmacéutica, Universidad de Cartagena, 2003.
 16. G. A. Rubio y W. R. Santos, “Selección de cepas rizobianas aisladas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) con potencial uso como biofertilizantes”, Tesis de Grado, Química Farmacéutica, Universidad de Cartagena, 2006.
 17. S. F. Wright, R. J. Wright, J. E. Sworobuk y D. G. Boyer, Effect of acid soil chemical properties on nodulation and competition of *Rhizobium trifolii*, *Comm. Soil. Sci. Plant Anal.*, **19**, 311 (1988).
 18. M. S. Jiménez, “Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para sombra de café en Puerto Rico”, Tesis de Maestría, Universidad de Puerto Rico, 2007.
 19. M. Abdullah, K. Al-Falih, Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*, *Pakistan J. Biol. Sci.*, **5**, 1277 (2002).
 20. J. E. Thies, P. W. Singleton y B. B. Bohlool, Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grow legumes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 19 (1991).
 21. J. E. Thies, P. W. Singleton y B. B. Bohlool, Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. *Appl. Environ Microbiol.*, **57**, 29 (1991).
 22. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, “Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico”, CIAT Eds., Cali, 1988, p. 203.
 23. P. Somasegaran y H. J. Hoben, “Handbook of *rhizobia*: methods in legume-*Rhizobium* technology”, Springer-Verlag Eds., New York, 1994, p. 450.
 24. F. Munévar y A. G. Wollum II, Effect of high root temperature and *Rhizobium* strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**, 1113 (1981).

25. E. P. Alarcón, A. Lozano y H. Chaparro, Caracterización fenotípica de los aislamientos rizobianos de Acacia (*Acacia sp*) y Retamo (*Teline monpessulana*), *Rev. Colomb. Quim*, 26, 21 (1997).
26. D. C. Jordan. En: "Bergey's manual of systematic bacteriology", Ed. por Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, Vol. 1, pp. 234–256.
27. B. D. W. Jarvis, P. van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernández, J. C. Cleyet-Marel y M. Gillis, Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 895 (1997).
28. B. Dreyfus, J. L. García, y M. Gillis, Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 89 (1988).
29. E. Thies, P. W. Singleton y B. B. Bohlool, Subgroup of the Cowpea miscellany: Symbiotic specificity within *Bradyrhizobium sp* for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogea* and *Macrotilium atropurpureum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1540 (1991).
30. A. Sessitsch, K. J. Wilson, A. D Akkermans y W. M. de Vos, Simultaneous detection of different *Rhizobium* strains marked with either the *Escherichia coli* *gusA* gene or the *Pyrococcus furiosus* *celB* gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4191 (1996).
31. G. Matos-Cuzcano, E. Ormeño-Orrillo y D. Zúñiga-Dávila, Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en la Costa Central del Perú, *Ecología*, 1, 42 (1998).
32. F. Barboza, N. Correa y S. Rosas. En "Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología", Santa Cruz de la Sierra, 1995, pp. 197.
33. S. Mpepereki, F. Makonese y A. G. Wollum, Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils, *Symbiosis* 22, 275 (1997).
34. N. E. Ghittoni, y M. A. Bueno, Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity, *Simbiosis*, 20, 117 (1996).

35. M. M. Yelton, S. S. Yang, S. A. Edie y S. T. Lim, Characterization of an effective salt-tolerant fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*, *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1537 (1983).
36. H. H. Zahran, *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 968 (1999).
37. D. Zúñiga, L. Pliego, J. Sanjuán y C. Lluch. En: "Avances en la investigación sobre fijación biológica de nitrógeno", Ed. por Chordi y Martínez, Salamanca, 1996, pp. 279-281.
38. L. O. Osa-Afiana y M. Alexander, Differences among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 435 (1982).
39. Z. Tong y M. J. Sadowsky, A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 581 (1994).
40. A. C. Johnson y M. Wood, DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium spp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3629 (1990).
41. A. E. Richardson, R. J. Simpson, M. A. Djordjevic y B. G. Rolfe, Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2541 (1988).
42. A. Peticari, N. Arias, H. Baigorri, J. De Battista, L. Lett, M. Montecchia, J. Pacheco Basurco, A. Simonella, S. Toresani, L. Ventimiglia y R. Vicentini. En: "El libro de la soja", Ed. por SEMA, Buenos Aires, 2003, pp. 69-76.
43. A. González Fletcher y A. Cortés Lombaña, "Estudio general de suelos de la zona del canal del dique (municipios de Arjona, Calamar, Mahates, María la Baja, San Estanislao, Santa Rosa, Soplaviento, Turbaco, Turbana y Villanueva)", Instituto Geográfico Agustín Codazzi Eds., Bogotá, 1982.
44. D. J. Brenner y J. T. Staley. En: "Bergey's manual of systematic bacteriology", Ed. por Williams and Wilkins, Baltimore, 2005, Vol. 2, pp. 334-446.
45. T. Wang y J. Martínez-Romero. Taxonomía de *Rhizobium*, URL: http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo12.pdf, junio 2009.

46. R. J. Kremer y H. L. Peterson, Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 636 (1982).
47. G. R. Xavier, L. M. V. Martins, M. C. P. Neves y N. G. Rumjanek. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population, *Biol. Fertil. Soils*, **27**, 386 (1998).
48. R. Martínez-Viera, "Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo", Científico-Técnica Eds., La Habana, 1986.
49. C. Fernández y R. Novo, "Vida microbiana en el suelo", Universidad de La Habana Eds., La Habana, 1988.
50. Y. A. Hamdi, "La fijación biológica del nitrógeno", FAO EDS., Roma, 1985.
51. L. Lloret y E. Martínez-Romero, Evolución y filogenia de *Rhizobium*, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **47**, 43 (2005).