

CARACTERIZACIÓN DE RHIZOBIA ASOCIADA A LA NODULACIÓN DE *Gliricidia sepium*.

Carlos Manuel Acosta-Durán¹, Luz Maria Nava Gómez¹,
Víctor López-Martínez¹, Dagoberto Guillén-Sánchez² e Irán Alia-Tejaca¹.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Av. Universidad 1001, col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos.
Correo-e: acosta_duran@yahoo.com.mx

²Universidad Autónoma del estado de Morelos, Campus Oriente, Nicolás Bravo s/n, Parque industrial Cuautla, Xalostoc, Morelos, México CP 62700.

Palabras Clave: *Sinorhizobium*, *Rhizobium tropici*, *Gliricidia sepium*, nodulación.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas arbóreas tienen un alto valor en programas de reforestación, conservación de suelos y como abonos verdes. Los simbioses de *Rhizobium* de *Acacia* y *Leucaena* han sido ampliamente estudiados, pero no existe conocimiento de las especies de *Rhizobium* que nodulan a otras leguminosas arbóreas tales como *Gliricidia sepium*. *G. sepium* es un miembro de la subfamilia Papilionidae que en ocasiones ha sido llamada "la alfalfa de los trópicos" porque puede ser usada como forraje para la producción animal (Ford, 1987). *G. sepium* es muy eficiente en el uso de agua y es nativa de América (Hughes, 1987).

Se han descubierto nuevas bacterias noduladoras en el grupo β -proteobacteria mediante el seguimiento de hospederos no caracterizados (Moulin *et al.* 2001). Anteriormente se caracterizó *Rhizobium tropici* y se encontró que es resistente a la acidez, a las altas temperaturas y a metales pesados (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Esas características muestran sus ventajas para su uso como inoculante en los trópicos. Actualmente varias cepas eficientes de *R. tropici* se están usando exitosamente en Brasil para la inoculación de frijol *Phaseolus vulgaris* (Mostasso *et al.*, 2002). En el laboratorio *R. tropici* nodula y fija nitrógeno en *Gliricidia maculata* y en otras leguminosas (Hernández-Lucas *et al.*, 1995). *Rhizobium tropici* ha sido

calificado como un nodulador oportunista del frijol (Martínez-Romero, 1996) y su hospedero natural es desconocido (Martínez-Romero, 1996; Graham and Vance, 2000).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente los aislados de *Rhizobium* de *G. sepium* con especial interés en las cepas de *Rhizobium tropici*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Aislamiento y crecimiento de las bacterias aisladas de nódulos.

Gliricidia sepium crece naturalmente en Santa Rosa, Morelos y Veracruz, Veracruz, México. Santa Rosa está a 900 msnm con una temperatura promedio de 24 °C y suelo arcillo arenoso (pH 6.3); Veracruz esta a nivel del mar con una temperatura promedio de 25.2 °C y suelo arenoso (pH 7.9). En cada uno de los lugares se colectaron nódulos que fueron procesados dentro de los primeros 3 días después de la colecta, se esterilizaron con hipoclorito de sodio y se aplastaron sobre placas de medio PY (peptona de caseína 5 g, extracto de almidón 3 g, CaCl₂ 0.6 g y agar 15 g por litro de H₂O) con o sin ácido nalidíxico (Nal, 20 mg/l), en medio mínimo (González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000) o en medio YM (Vincent, 1970). Se realizó una prueba de esterilidad de la superficie de los nódulos; se purificó una colonia de cada nódulo y se probó su crecimiento en medio PY sin calcio y con antibióticos a 28 y a 37 °C. Se probó el crecimiento en placas con medio Luria-Bertani (LB). También se llevaron a cabo otras

pruebas fenotípicas como lo describen Wang *et al.* (1998).

Análisis PCR-RFLP de los genes 16S rRNA y sus secuencias.

Se sintetizaron fragmentos casi completos del gen 16S rRNA en PCR con taq polimerasa usando los "primers" fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991) y digeridos con las enzimas de restricción *Hinfl*, *HhaI*, *MspI*, *RsaI*, *DdeI* y *Sau3AI*. Los patrones de los fragmentos resultantes fueron comparados con aquellos obtenidos de las cepas "tipo" de especies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Se obtuvieron secuencias parciales de genes 16S rRNA de las cepas CFNEV21 (1029 pb, número de acceso al GenBank AF480573), CFNER34 (754 pb, número de acceso al GenBank AY079179 y AY079180), y CFNER90 (973 pb, número de acceso al GenBank AF480572) (Rogel *et al.*, 2001). Las secuencias fueron alineadas y analizadas con los programas GCG y ClustalW. Se obtuvieron productos de PCR del gen *nifH* de CFNER90 con los "primers" *nifH1* y *nifH2* (Eardly *et al.*, 1992) y se secuenciaron (455 pb, número de acceso al Genbank AY079181).

Electroforesis de enzimas multilocus.

Los aislados bacterianos fueron crecidos en medio líquido PY. Se prepararon extractos como describen Wang *et al.* (1998) y corridos en electroforesis en geles de almidón o de almidón (7.5%) más agarosa (1.5%) (Selander *et al.*, 1986). Las enzimas metabólicas que se probaron fueron las siguientes: hexokinasa, glutamato,

glucosa 6-fosfato, malato, alanina, isocitrato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa y enzima málica.

Perfiles de plásmidos y ensayos de hibridación. Se siguió un procedimiento modificado de Ekhardt (Hynes and McGregor, 1990) para visualizar los plásmidos en geles de agarosa. El DNA fue extraído con el kit genómico (Amersham Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. También se realizaron hibridaciones "Southern blot" como lo describen previamente Wang *et al.* (1998).

Ensayos de nodulación en plantas. Se esterilizaron superficialmente semillas de *G. sepium* ecotipo "Morelos" y se germinaron en agar, posteriormente las plántulas se colocaron en conos forestales de plástico de 20 cm de largo con vermiculita estéril en invernadero y en cámara de crecimiento. Se escarificaron semillas de *Acacia farneciana* con ácido sulfúrico concentrado. Se crecieron plántulas de *Leucaena* y *Acacia* en un medio de Farhaeus sin nitrógeno (Farhaeus, 1957) en jarras con vermiculita. Se crecieron semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* usando un soporte de algodón. Las raíces de las plántulas fueron inoculadas con 10^5 bacterias al momento del trasplante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados de rhizobia de *G. sepium* fueron obtenidos de 164 nódulos de raíz de cuatro árboles de Santa Rosa y de 40 nódulos de 19 árboles de Veracruz.

Los nódulos de *G. sepium* son multilobulados y de crecimiento indeterminado.

Aislados de Santa Rosa. Se pudieron distinguir claramente tres grupos principales de los aislados de Santa Rosa basados en las características fenotípicas y morfológicas. Varios representantes de cada grupo fueron analizados mediante patrones aloenzimáticos (Figura 1) y por PCR-RFLP de 16S rDNA (Cuadro 1). Un grupo presentó patrones de PCR-RFLP de 16S rDNA similares a los de *Sinorhizobium terangaie*. El segundo grupo que comprendió el 25 % de los aislados, fue asignado a *Rhizobium tropici* tipo B basados en la secuencia de los genes 16S rRNA de una cepa representativa (CFNER90), con 7 diferencias de nucleótidos en 863 bases (98.9 % de identidad) comparada con *Rhizobium tropici* tipo B cepa CIAT899. La asignación también fue hecha basada en las características fenotípicas típicas que distinguen a las cepas de *Rhizobium tropici* tipo B, es decir resistencia a la carbenicilina (1 g l^{-1}) y cloramfenicol (5 g l^{-1}), crecido a 37°C y crecido en medios LB y PY sin calcio; sin embargo, las cepas de Santa Rosa tipo B *Rhizobium tropici* fueron mas gomosas que la cepa de referencia CIAT899. Un tercer grupo abarcando el 26 % de los aislados, fue encontrado altamente similar a cepas de *Rhizobium tropici* tipo A por sus características morfológicas: las cepas fueron no gomosas, fueron sensibles a los antibióticos mencionados arriba y no crecieron en LB o en PY sin calcio. Además los fragmentos del gen 16S

rRNA de una cepa representativa de este grupo (CFNER34) fue casi idéntica (99.8 %) a la CFN299 (1 base diferente en 754 bases).

Solo uno de los aislados de Santa Rosa se agrupó con cepas de *Rhizobium etli* de acuerdo con sus patrones de 16S rRNA (Cuadro 1). Las características reiteradas del gen *nifH* de la cepa *Rhizobium etli* fueron encontradas en CFNER343 (no se muestran); por lo consiguiente este aislado fue asignado al biovar *phaseoli*. CFNER343 también presentó un gran número de plásmidos como en otras cepas de *Rhizobium etli* (Figura 2). Anteriormente la cepa de *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* fue encontrada nodulando *Gliricidia maculata* bajo condiciones de laboratorio (Hernández-Lucas *et al.*, 1995).

Aislados de Veracruz. Todas las cepas de nódulos de *G. sepium* de Veracruz, fueron morfológicamente idénticas entre ellas y en tasa de crecimiento a *Rhizobium tropici* tipo A cepa CFN299 en medio PY, pero menos gomosas que la CFN299 en medio YM. También fueron incapaces de crecer a 37 °C, en medio LB o en presencia de carbenicilina y cloramfenicol, como la CFN299. Los aislados tuvieron patrones de restricción idénticos de 16S rDNA (Cuadro 1) y la secuencia del gen 16S rRNA de un representante (CFNEV21) fue también idéntica (99.9 %) a la de *Rhizobium tropici* CFN299 (1 base diferente en 1 029 bases). Los patrones de plásmidos encontrados en algunos aislados de Veracruz fueron similares a los de CFN299 pero en otras, también se detectaron plásmidos más pequeños (Figura 2).

Cuadro 1. Patrones de 16S rDNA de aislados seleccionados de nódulos de *Gliricidia sepium* y de cepas de referencia. Las diferentes letras representan los patrones de los productos de PCR obtenidos respectivamente con las enzimas de restricción (*MspI*, *HindI*, *HhaI*, *RsaI*, *DdeI*) como describen Wang y col. (1999) siguiendo la técnica de Laguerre y col. (1994).

Patrones 16S rDNA	
<i>Sinorhizobium</i> <i>S. teranga</i> ORS51 (cepa de referencia) ^a	LBIAF
<i>Rhizobium</i> <i>R. tropici</i> CFN299 (cepa de referencia)	EBFDL
<i>R. tropici</i> tipo A (aislado de Veracruz) ^b	EBFDL
<i>R. tropici</i> tipo A (aislado de Santa Rosa) ^c	EBFDL
<i>R. tropici</i> CIAT899 (cepa de referencia)	FBDDBE
<i>R. tropici</i> tipo B (aislado de Santa Rosa) ^d	FBDDBE
<i>R. etli</i> CFN42 (cepa de referencia)	DBECE
<i>R. etli</i> CFNER343	DBECE

^ade Lajudie *et al.* (1994). ^bAislados CFNEV3, CFNEV13, CFNEV16, CFNEV17, CFNEV19, CFNEV21, CFNEV24, CFNEV32, CFNEV34, CFNEV35, CFNEV37. ^cAislados CFNER2, CFNER6, CFNER13, CFNER18, CFNER26, CFNER34, CFNER35, CFNER40, CFNER41, CFNER44, CFNER47, CFNER51. ^dAislados CFNER76, CFNER83, CFNER85, CFNER88, CFNER90.

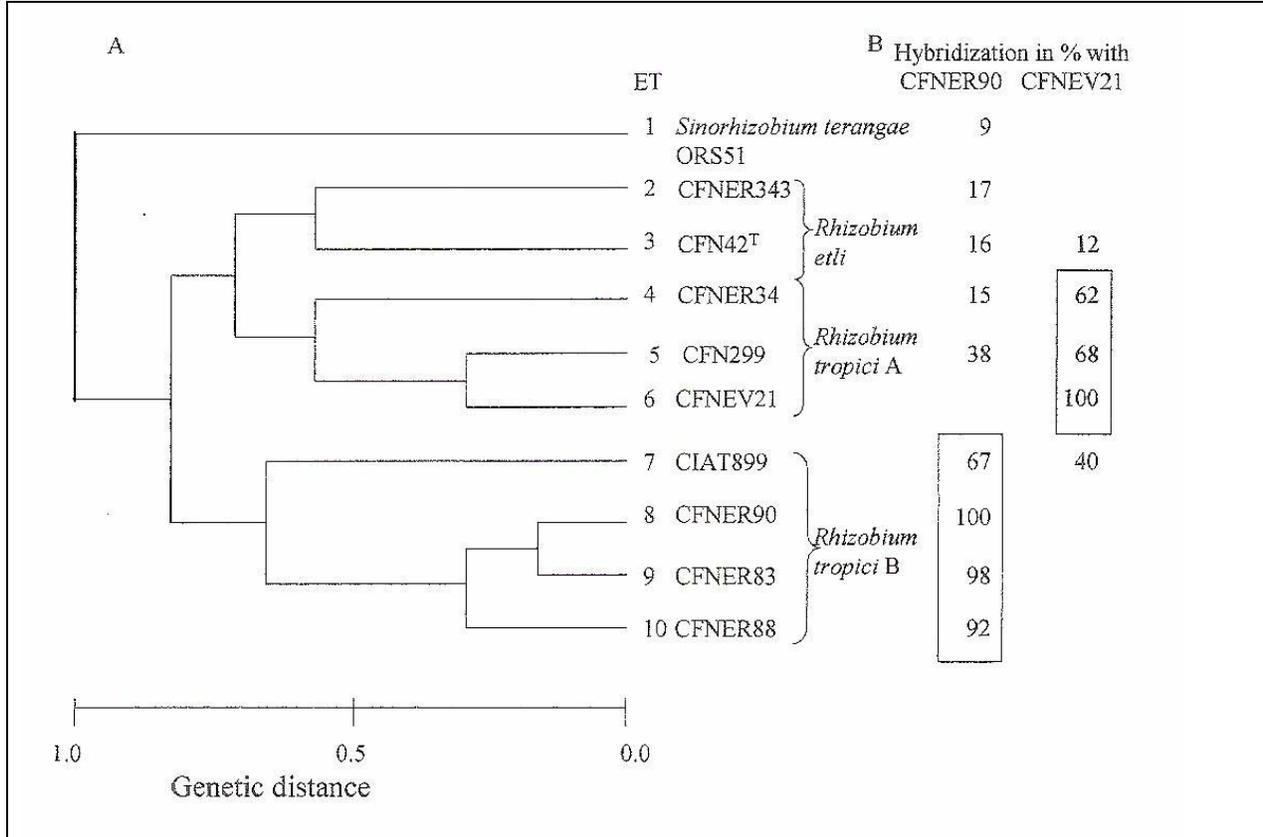


Figura 1. **A.** Relaciones genéticas de los aislados de *G. sepium*, incluyendo las cepas de referencia de *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli*. El dendrograma se construyó con datos de electroforesis de enzimas multilocus con las enzimas metabólicas mencionadas en los materiales y métodos. Otros aislados que corresponden al tipo electroforético 5 son: CFNEV13, CFNEV16, CFNEV19, CFNEV24, CFNEV32, CFNEV34, CFNEV35 y CFNEV37.

B. Hibridación DNA-DNA como porcentaje relativo a las cepas de referencia. El DNA de la cepa CFNER90 también se hibridizó con el DNA de las especies (% de hibridación entre paréntesis): *Rhizobium leguminosarum* USDA2370 (15), *Rhizobium giardinii* H152 (9), *Rhizobium gallicum* R602 (12), *Rhizobium mongolense* USDA1844 (12) y *Rhizobium galagae* USDA4128 (14).

Características de *Rhizobium tropici*.

Los aislados de *Rhizobium tropici* tipo A y B, de Veracruz y de Santa Rosa fueron resistentes a NaI (20 mg l⁻¹), crecieron en pH de 4.5, y presentaron

un megaplásmido de tamaño similar (Figura 2). La gran distancia genética observada por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) entre las cepas de *Rhizobium tropici* B en México y las de

Brasil (Figura 1) probablemente indica que divergen desde hace mucho tiempo.

Se realizó una caracterización más completa de un aislado de Santa Rosa (CFNER90) y uno de Veracruz (CFNEV21), se determinaron los patrones de hibridación del gene *nifH* y los niveles de hibridación total DNA-DNA. Adicionalmente se secuenció un fragmento parcial del gene *nifH* de CFNER90, que mostró una alta similaridad (96%) con la cepa BR6001 de *Rhizobium tropici* tipo B (Haukka *et al.*, 1998) y con la cepa de referencia CIAT899 tipo B de *Rhizobium tropici*. La hibridación del gene *nifH* de CFNEV21, CFNER34, CFNER90, CIAT899 y CFN299 revelaron una banda idéntica de alrededor de 8 kb con el DNA digerido con *EcoR1* (no mostrado). Los resultados de la hibridación total DNA-DNA se muestran en la figura 1. El DNA de CFNER90 hibridizó 67% con el DNA de *Rhizobium tropici* y 92-98% con el DNA de otros *Rhizobium tropici* tipo B aislados de Santa Rosa. El DNA total de CFNEV21 (de Veracruz) hibridizó 68% con el DNA de CFN299, 100% con el DNA de CFNEV34 (de Veracruz) y 40% con el DNA de la cepa CIAT899. Las cepas de *Rhizobium tropici* tipo A y B tienen valores de hibridación DNA-DNA de alrededor de 36% (Martínez-Romero *et al.*, 1991) por esta razón y debido a sus diferencias en las secuencias de los megaplásmidos, se ha propuesto que son diferentes especies (Geniaux *et al.*, 1995), pero la existencia de cepas con características intermedias entre las cepas de tipo A y B están en contra de esta propuesta (Martínez-Romero, 1996; Mostasso *et al.*, 2002).

Los nódulos en *G. sepium* (ecotipo Morelos) aparecen después de 8 días de la inoculación con diferentes cepas probadas en cámaras de crecimiento. En el laboratorio, los aislados de *Rhizobium tropici* tipo A y B aislados de *G. sepium* se encontraron nodulando *Phaseolus vulgaris* (frijol común) y formaron un promedio de 15 nódulos fijadores de nitrógeno a los 14 días después de la inoculación, similar al número de nódulos formados por aislados de *Rhizobium tropici* de frijol. Los aislados tipo B de *G. sepium* fueron adicionalmente probados en *Acacia farnesiana* y *Leucaena leucocephala* y se encontró que también nodulan muy bien.

Se han aislado cepas de *Rhizobium* con características fenotípicas diferentes dependiendo de la altitud geográfica (Melchor-Marroquín *et al.*, 1999) pero las especies de *Rhizobium* no fueron caracterizadas. Se encontró que la fijación de nitrógeno por *G. sepium* esta influenciada por el genotipo de la planta, la cepa bacteriana (Awonike y Hardarson, 1992) y las condiciones ambientales (Sanguinga *et al.*, 1991). La identificación de los simbioses de *G. sepium* puede ayudar a promover su inoculación y aumentar la productividad para su uso como forraje para la ganadería. *Rhizobium tropici* frecuentemente es usado como un modelo de estudio de la interacción planta-bacteria, la identificación de un hospedero natural de *Rhizobium tropici* podría enriquecer el panorama de la investigación en su interacción con las plantas.

RECONOCIMIENTOS.

Agradecemos a DGAPA PAPIIT IN201600 por el financiamiento parcial del proyecto, a Marco Antonio Rogel y J Martínez por el apoyo técnico.

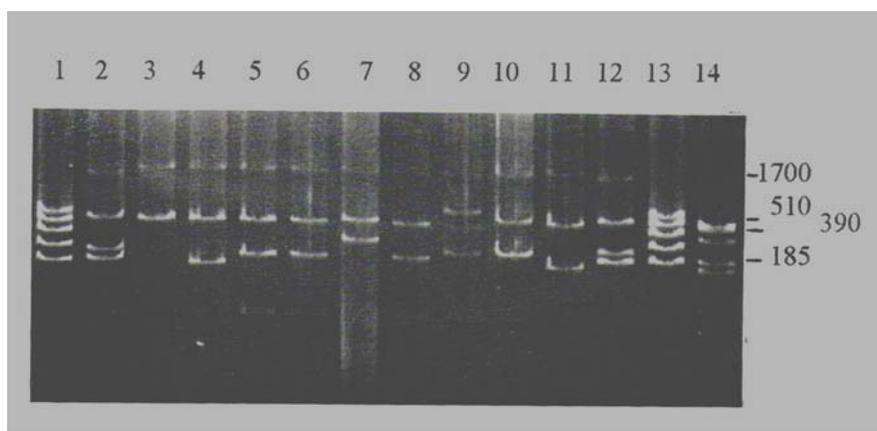


FIGURA 2. Patrones de plásmidos. Líneas 1,13 *Rhizobium etli* cepa de referencia CFN 42, líneas 2, 12 *R. tropici* tipo A cepa de referencia CFN299. *R. tropici* tipo A aislados de Veracruz: línea 3 CFNEV19, línea 4 CFNEV13, línea 5 CFNEV24, línea 6 CFNEV32, línea 8 CFNEV21, línea 11 CFNEV37; línea 7 CFNER34 de Santa Rosa. *R. tropici* tipo B: línea 9 CFNER90 de Santa Rosa, línea 10 CIAT899. Línea 14 *R. etli* de Santa Rosa aislado CFNER343. Los marcadores de peso molecular están en kb.

LITERATURA CITADA

Awonaike K.O. and G Hardarson. 1992. Biological Nitrogen Fixation of *Gliricidia sepium/Rhizobium* symbiosis as influenced by plant genotype, bacterial strain and their interactions. Trop. Agric.(Trinidad) 69(4): 381-385.

De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kesters K, and

Gillis M. 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.

Eardly BD, Young JPW, Selander RK. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus*

vulgaris, based on partial sequences of the 16S rRNA and nifH genes. Appl Environ Microbiol 58: 1809-1815.

Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. J Gen Microbiol 16:374-381.

Ford LB. 1987. Experiences with *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. in the Caribbean. In: Withington D, Guber N, Brewbaker JL (eds) *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp.: management and improvement, Proceedings. Nitrogen Fixing Tree Association special publication. Nitrogen Fixing Tree Association, Costa Rica, 87:3-7.

Geniaux E, Flores M, Palacios R, Martínez E. 1995. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. Int J Syst Bacteriol 45:392-394.

González-Pasayo R, Martínez Romero E. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. Mol Plant Microb Interact 13: 572-577.

Graham PH, Vance CP. 2000. Nitrogen Fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field Crop Res 65: 93-107.

Haukka K, Lindström K, and Young JPW. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous tree growing in Africa and Latin America. Appl Environ Microbiol 64: 419-426.

Hernandez-Lucas I, Segovia, L, Martínez-Romero E, Pueppke SG. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl Environ Microbiol 61: 2775-2779.

Hughes, C. 1987. Biological considerations in designing a seed collection strategy for *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (Leguminosae). Commonwealth Forestry Review 66: 31-48.

Hynes MF, McGregor NF. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol Microbiol 4: 567-574.

Laguerre G, Allard M-R, Revoy F and Amarger N. 1994. Rapid identification of *Rhizobia* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 60 (1), 56-63.

Martinez-Romero E. 1996. Comments on *Rhizobium* systematics. Lessons from *R. tropici* and *R. etli*. In: Stacey G, Mullin B, Gresshoff pm (eds). Biology of plant-microbe interactions. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul. Minnesota, pp 503-508.

Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante F M, Franco A A, Graham P and Pardo M A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L beans and *Leucaena* sp trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 417-426.

Melchor-Marroquin JI, Vargas-Hernández JJ, Ferrara-Cerrato R, Krishnamurthy L. 1999. Screening *Rhizobium* spp. associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, México. *Agroforestry Systems* 46: 25-38.

Mostasso L, Mostasso FL, Díaz BG, Vargas MAT, Hungria M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crop Res* 73:121-132.

Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C. 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950.

Rogel M A, Hernández-Lucas I, Kuykendall L D, Balkwill D L, and Martínez-Romero E. 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adherens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl Environ Microbiol* 67: 3264-3268.

Sanguinga N., Manrique K and Hardarson G. 1991. Variation in nodulation and N₂ fixation by the *Gliricidia sepium/Rhizobium* spp. Symbiosis in calcareous. *Soil Biol. Ferti. Soils* 11, 273-278.

Selander R K, Caugant D A, Ochman H, Musser J M, Gilmour M N and Whittam T S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetic and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51: 873-884.

Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Burgess and Son LTD. Great Britain.

Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX and Martínez-Romero E. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. Nov. a Symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galagae*. *Int J Syst Bacteriol* 48: 687- 699.

Wang ET, van Berkum P, Siu XH, Beyene D, Chen WX, Martínez-Romero E. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 51-65.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697- 703.