

LA DIVERSIDAD DEL *RHIZOBIUM* ASOCIADO CON *PHASEOLUS VULGARIS* L. EN ECUADOR, Y COMPARACIONES CON EL *RHIZOBIUM* DE MÉXICO³.

G. Bernal¹ y P.H. Graham²

¹ Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, E.E. Santa Catalina. Casilla 17-01-340. Departamento de Protección Vegetal. Quito, Ecuador.

² Universidad de Minnesota. Departamento de Suelos. Saint Paul, MN 55108, USA.

³ Trabajo publicado en el *Canadian Journal of Microbiology*. Vol.47, 6:526-534.

RESUMEN

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene sus centros de origen en Mesoamérica y en los Andes de América del Sur, y ha sido domesticado en las dos regiones desde hace probablemente 5000 años. Un tercer mayor acervo genético podría existir en el Ecuador y en el Norte del Perú. La diversidad de *Rhizobium* asociada con el fréjol ha sido estudiada casi exclusivamente con énfasis en el centro de origen Mesoamericano. Este estudio compara el *Rhizobium* de fréjol de México y del Ecuador usando métodos fenotípicos y filogenéticos. Cuando diferencias entre los dos grupos de *Rhizobium* fueron encontradas, entonces se estudio la influencia del cultivar de fréjol sobre el número más probable (NMP), y la biodiversidad del *Rhizobium* aislado de diferentes suelos. Usando análisis fenotípico y de componentes principales de los patrones de bandas Box A1R-PCR, se distinguieron tres grupos de *Rhizobium*. Ellos correspondieron principalmente a los aislamientos de México, del norte y sur de la región Andina, con los aislamientos del sur del Ecuador exhibiendo diversidad genética significativa. El *Rhizobium* de *Dalea* spp., el cual es efectivo e infectivo en fréjol, pudo haber contribuido a la diversidad aparente de la bacteria de la región Mesoamericana, mientras que el *Rhizobium* de *Phaseolus aborigineus* de Argentina mostró similitud limitada a los otros *Rhizobium* de fréjol evaluados. El uso como hospederos de los cultivares de *P. vulgaris* pertenecientes a los acervos genéticos de Mesoamerica y de los Andes no afectó significativamente el NMP de *Rhizobium* en los suelos de cada región, pero influyó la diversidad del *Rhizobium* aislado. Tales diferencias en compatibilidad del hospedero y su *Rhizobium* podría ser un factor de la pobre reputación del cultivo en nodulación y fijación de nitrógeno.

INTRODUCCION

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo importante en Latinoamérica y África, con evidencias arqueológicas que sugieren que el cultivo tiene centros de origen y/o domesticación posiblemente desde hace 5000 años tanto en Mesoamérica como en los Andes de América del Sur (Kaplan 1965, 1980; Kaplan et al. 1973). Un tercer acervo genético mayor identificado usando AFLP (amplified fragment length polymorphism), ha sido identificado en el Ecuador y en norte del Perú (Tohme et al. 1995), y algunas razas de *P. vulgaris* han sido reportadas en Mesoamerica (Beebe et al. 2000).

Por lo menos seis especies de *Rhizobium* (*etli*, Segovia et al. 1993; *tropici*, Martinez-Romero et al. 1991; *leguminosarum* bv. *phaseoli*, Jordan 1984; *giardinii* y *gallicum*, Amarger et al. 1997; y *Bradyrhizobium* spp., Lange 1961) nodulan esta leguminosa promiscua (Michiels et al. 1998). Sin embargo, la mayoría de estudios relacionados con la diversidad de *Rhizobium* asociado con fréjol ha enfatizado únicamente *R. tropici* y *R. etli*, y se han centrado casi exclusivamente en la bacteria de la región Mesoamericana. Ya que el germoplasma de *Phaseolus* en cada centro de origen es suficientemente diferente que cruzamientos entre material de las dos regiones frecuentemente dan como resultado deformaciones genéticas (Gepts y Bliss 1985; Koinange y Gepts 1992), se anticipa también diferencias en el *Rhizobium* asociado con este hospedero.

La diversidad genética entre el *Rhizobium* de la región Mesoamericana es extremadamente alto (Pinero et al. 1988; Souza et al. 1994); siendo posiblemente una de las razones la inclusión entre las

cepas estudiadas, de cepas de *Dalea*. *Dalea* spp., es una leguminosa nativa de la región (Barneby 1981, 1988,1990) y su *Rhizobium* nodula y fija nitrógeno (N₂) con fréjol (Graham et al. 1999).

El presente estudio primeramente contrasta el *Rhizobium* de fréjol de Mesoamerica y de los Andes de América del Sur, usando métodos fenotípicos y filogenéticos, y posteriormente examina las diferencias en el número, y la diversidad del *Rhizobium* aislado de suelos, usando como hospedero germoplasma de Mesoamerica y de los Andes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Rhizobium*

Las cepas de este estudio fueron de las siguientes fuentes: i) 69 cepas de Ecuador provenientes de la colección mantenida en el laboratorio de Rhizobiología del Departamento de Suelos de la U. de Minnesota (www. *Rhizobium*.umn.edu), ii) cepas del Perú (11), Kenya (1), y Argentina (9), incluyendo cepas de *Phaseolus aborigineus* (cortesía del Dr. Daniel Debouck, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), y iii) ocho aislamientos de México (cortesía de la Dra. Valeria Souza, Universidad Autónoma de Mexico, Cuernavaca). Cepas estándar o bien estudiadas fueron incluidas como referencias (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de referencia (tipos) de *Rhizobium* usadas en este estudio.

Species	UMR No1	Synonym	Host	Reference
<i>R. etli</i>	1632	CIAT 632	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Graham et al. (1982)
<i>R. gallicum</i>	6918	R602spT	<i>P. vulgaris</i>	Amarger et al. (1997)
<i>R. giardinii</i>	6917	H152T	<i>P. vulgaris</i>	Amarger et al. (1997)
<i>R. tropici</i> IIA	1178	IAPAR47	<i>P. vulgaris</i>	Martinez et al. (1991)
<i>R. tropici</i> IIB	1899	CIAT 899T	<i>P. vulgaris</i>	Graham et al. (1982) Martinez et al. (1991)
<i>Rhizobium</i> spp. (<i>Coronilla</i>)				
	6860	31A3	<i>C. cretica</i>	Graham et al. (1999)
	6864	31A5	<i>C. cretica</i>	Graham et al. (1999)
<i>Rhizobium</i> spp. (<i>Dalea</i>)				
	6815	-	<i>D. purpurea</i>	Graham et al. (1999)
	6833	-	<i>D. purpurea</i>	Graham et al. (1999)
	6859	-	<i>D. purpurea</i>	Graham et al. (1999)
<i>Rhizobium</i> spp. (<i>Onobrychis</i>)				
	6861	116A12	<i>O. viciifolia</i>	Graham et al. (1999)

Para confirmar la pureza, todos los aislamientos fueron probados en medio de cultivo levadura-manitol-agar (LMA) mas 25 ppm rojo congo, y en medio glucosa-peptona (GP) agar mas 100 ppm de bromocresol purpura (Somasegaran y Hoben 1994). Los cultivos puros fueron almacenados a -70° C en caldo levadura-triptona-glicerol (15%).

Caracterización fenotípica

Para la caracterización fenotípica, se evaluaron 103 cepas usando las metodologías de Amarger et al. (1997). Para cada medio evaluado, un inoculador “multipunto” fue cargado con células de una suspensión fisiológicamente fresca conteniendo aproximadamente 10⁵ células por mL. Entonces fueron transferidas a la superficie del medio de cultivo correspondiente. Los medios fueron

incubados por 7 días a 28° C, después de lo cual fueron evaluadas por la presencia o ausencia de crecimiento.

Las fuentes de carbono y nitrógeno evaluadas incluyeron sorbosa, tartrato, D-glucuronic, eritritol, dulcitol, gluconato, citrato, lactato, L-glicina, L-triptofano, y L tirosina. Cada fuente fue usado a una concentración final de 1 g. L⁻¹ en un medio conteniendo los siguientes reactivos (g. L⁻¹): 1 K₂HPO₄, 1 KH₂PO₄, 0.01 FeCl₃·6H₂O, 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.1 CaCl₂, 1 (NH₄)₂ SO₄, y 20 g de agar.

La resistencia a los antibióticos ácido nalidixico (40 ug.mL⁻¹), estreptomycin (3 ug.mL⁻¹), espectinomycin (5 ug.mL⁻¹), y kanamicina (10 ug.mL⁻¹), fue evaluada en medio de cultivo triptona-extracto de levadura-agar (TEA) (Beringer, 1974). La tolerancia a metales pesados fue evaluada en el mismo medio siguiendo la metodología de Zhang et al. 1991. Para esto, se utilizo los siguientes reactivos: CuCl₂·2H₂O (100 ug.mL⁻¹), AlCl₃·6H₂O (500 ug.mL⁻¹), HgCl₂ (5 ug.mL⁻¹), CdCl₂·2H₂O (20 ug.mL⁻¹), ZnCl₂ (100ug.mL⁻¹), y Pb(CH₃COO)₂ (500 ug.mL⁻¹).

Los requerimientos de vitaminas para ácido nicotínico, tiamina-HCl, pantotenato de Ca, y biotina, fueron analizados usando medio de cultivo definido (Lindstrom y Lehtomaki, 1988), en el cual una de las vitaminas fue omitida para probar su requerimiento. La tolerancia a NaCl (0.5%, 1%, y 2%) y el crecimiento a pH 4.5, 5.0, y 8.5 fue evaluada usando medio TEA, con los correspondientes niveles de NaCl y pH. También se evaluó el crecimiento en medio TEA ausente de calcio, y en medio Luria-Bertani (Sambrook et al. 1989).

La habilidad de las cepas para nodular *Macroptilium atropurpureum*, *Leucaena leucocephala*, *Dalea purpurea*, *Coronilla varia*, *Onobrychis viciifolia* y *Phaseolus vulgaris* fue examinada usando macetas Magenta (Sigma, St. Louis, Mo.), con una mezcla (2:1) de 300 g de cuarzo (Unimin, La Sueur, MN) y turba no fertilizada (Sungro Horticultura Inc., Bellevue, Wash.) mas 80 mL de solución nutritiva para plantas sin nitrógeno (McDermott y Graham 1990). Las macetas fueron esterilizadas en autoclave por 45 minutos a 121°C. Las semillas de todas las especies excepto *Macroptilium* y *Leucaena* fueron desinfectadas superficialmente en cloretol 3% (Vincent 1970), luego lavadas cinco veces con agua destilada estéril. La germinación se la hizo en platos petri estériles con agar (2%) por tres días a 28°C, para luego plantar dos semillas por maceta. Las semillas de *Macroptilium* y *Leucaena* fueron escarificadas usando ácido sulfúrico concentrado y luego desinfectadas como se describe arriba. Las cepas de *Rhizobium* usadas como inoculantes fueron crecidas por 48 horas a 24°C en caldo levadura-manitol, y diluidas (1 en 100) con agua destilada estéril, para luego aplicar 2 mL por maceta. Dos macetas fueron inoculadas por cada cepa. Las plantas crecieron en cámara de crecimiento (Convicon PGW36, Controlled Environment Ltd., Winnipeg, Man., Canada) con fotoperíodo de 14 horas y una temperatura de 25°C día /18°C noche. Las plantas fueron cosechadas cinco semanas después de la inoculación para verificar nodulación.

Caracterización filogenética

Para comparar cepas seleccionadas del Ecuador y México, y para estudiar diferencias en la biodiversidad entre el *Rhizobium* aislado de cultivares apropiados de fréjol cultivados en suelos colectados en México y Ecuador, se utilizo la técnica Box A1R-PCR (Versalovic et al. 1994). Para esto, las cepas puras fueron crecidas en 10 mL de medio triptona-levadura (TL) por 72 horas, entonces 1 mL de cultivo fue suspendido en 10 mL de medio fresco e incubado a 24°C por 15 horas. Para cada cepa, 3 mL de cultivo fue centrifugado a 10000 x g, y el pellet resuspendido en 750 uL de bufer Tris-EDTA (TE) (Sambrook et al. 1989) y almacenado a 20°C. Para el análisis del PCR usando bacteroides, se escogieron al azar 25 nódulos por planta de cinco semanas de edad. Los nódulos fueron lavados y esterilizados superficialmente, luego de lo cual fueron introducidos en microtubos de 1.5 mL de capacidad y colocados sobre hielo. Se adiciono 1 mL de bufer TE para luego macerar el nódulo usando palillos estériles de polipropileno. El resto vegetal del nódulo fue

removido por centrifugación a 1000 x g por 13 minutos, luego de lo cual el bacteroide fue sedimentado por centrifugación por 5 minutos a 10000 x g, lavado en bufer TE, y recentrifugado. Los bacteroides fueron entonces resuspendidos en 50 uL TE, almacenados a -70°C, y usados después de 24 horas.

El análisis de Box AIR-PCR fue llevado a cabo tal como lo describe Versalovic et al. (1994), usando el primer C-09 (CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G) sintetizado por Gibco BRL (Grand Island, N.Y.) y un termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, Mass.). Alícuotas de 10 uL del producto PCR fueron separadas sobre agarosa 1.5%, en geles de 20 x 25 cm y valores de electroforesis de 105 V por 5.5 horas tal como describe Sambrook et al. (1989). Cepas de referencia, y un ladder DNA de 1 kb fueron incluidos en cada gel.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y luego analizados cuantitativamente usando el programa BioNumerics versión 1.5 (Applied Maths, Kortrijk-Belgica). La posición de las bandas de cada gel fue normalizado para facilitar la comparación entre geles. La normalización fue realizada usando las bandas entre 200 y 2000 bp, un lader de 1kb como estándar de referencia externa, y una banda comun para todos los aislamientos como el estandar interno. La curva densitometrica fue analizada usando el coeficiente de correlación Pearson. El análisis de cluster usó el método UPGMA para generar dendogramas mostrando la relación genética entre cepas. La opción de componentes principales en el programa BioNumerics fue también utilizada para mostrar diferencias entre cepas. Las diferencias en la diversidad genética fueron determinadas usando el index de Shannon-Weaver, análogo al análisis de la diversidad del gene de Nei (Goodwin et al. 1995; Mahuku et al. 1998; Coutinho et al. 1999), y calculado usando la ecuación:

$$1) H = \sum p_i \times \ln p_i$$

donde H es la diversidad genética estimada (DGE), y p_i es la frecuencia de aislamientos pertenecientes a cada clase de bandas. La variancia de la diversidad, y la prueba t para comparaciones fueron usadas de acuerdo a Magurran (1988).

Determinación de la población usando el numero más probable (NMP)

Cuando se encontró diferencias entre el *Rhizobium* de Mesoamerica y el de los Andes, se llevo a cabo estudios para determinar la influencia del origen del cultivar de fréjol sobre el numero y la diversidad del micro simbiote obtenido de suelos representativos. Se comparó suelos de Poconichim (México), Cotacachi (norte del Ecuador), y Cañicapac, Mangucusana, y Mater (sur del Ecuador). El NMP fue determinando mediante la metodología de Somasegaran y Hoben (1994), usando fundas de crecimiento para *Phaseolus*, o tubos de 20 x 5 cm para *Dalea*. Los cultivares usados en esta evaluación incluyeron Puebla 152 de Mesoamerica, y Bolones M6, Cañicapac y Mater del Ecuador. *Dalea aurea* y *Dalea leporina* se incluyeron como hospederos en algunos conteos. Las plantas fueron crecidas por cinco semanas en una cámara de crecimiento Conviron PGW36 tal como se indica arriba, para luego ser cosechadas y proceder a la evaluación de la presencia de nódulos. El NMP fue entonces calculado usando el programa MPNES (*NifTAL*, Maui, Hawai). Nódulos representativos de los diferentes cultivares fueron sujetos al análisis Box AIR-PCR para generación de los “fingerprints”.

RESULTADOS

Diferencias fenotípicas y genotípicas entre el *Rhizobium* de fréjol del Ecuador y Mesoamerica

La Figura 1 muestra las relaciones fenotípicas entre las 103 cepas de *Rhizobium* de fréjol evaluadas en este estudio.

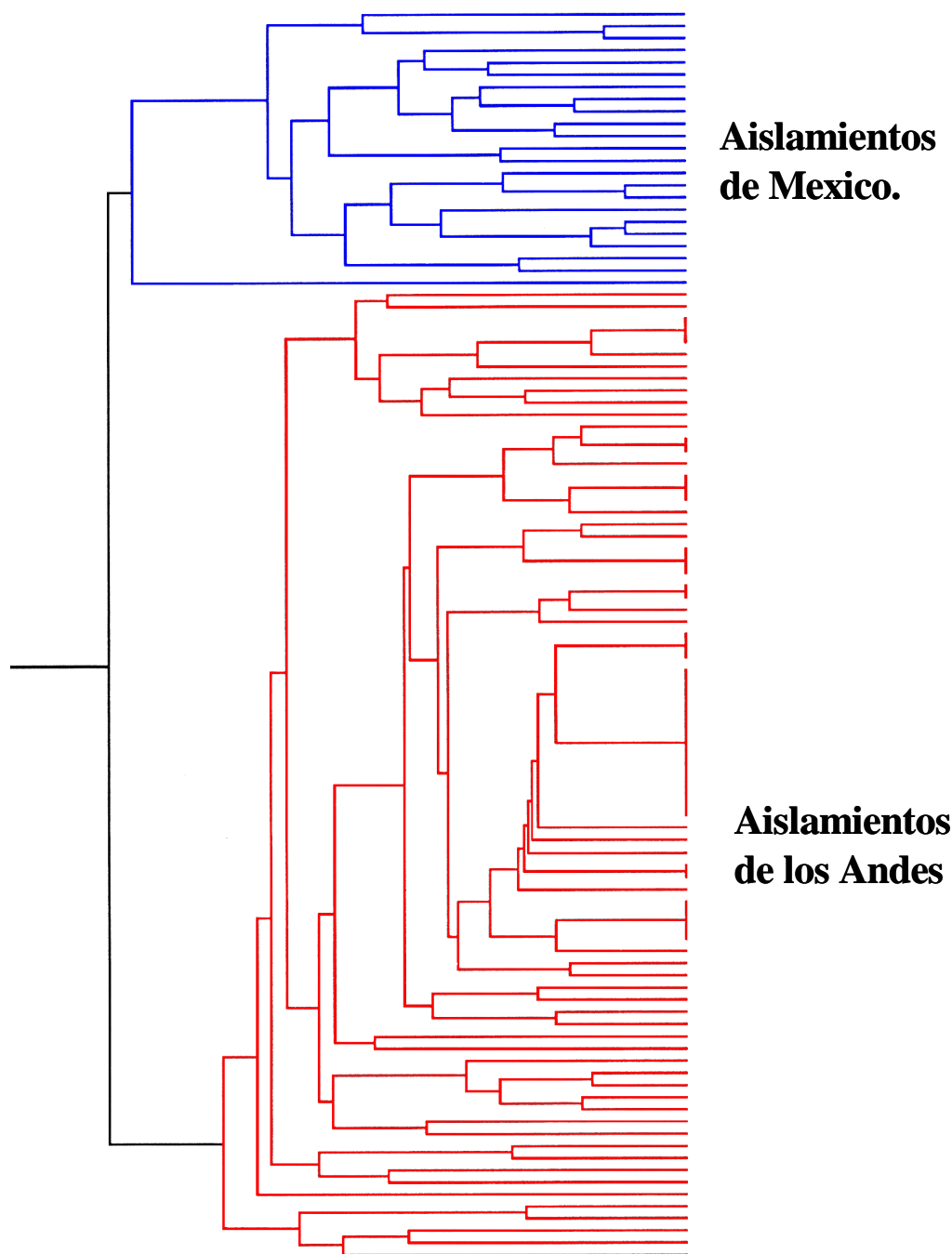


Figura 1. Dendrograma (UPGMA) mostrando relaciones fenotípicas entre aislamientos de *Rhizobium* de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) aislados en Ecuador (ECU), y cepas representativas de México (MEX), Perú (PER), Argentina (ARG) y Kenia (KEN). Las letras C (Carchi), I (Imbabura), CH (Chimborazo), B (Bolivar), A (Azuay) y L (Loja) se refieren a provincias específicas del Ecuador. Algunos aislamientos Ecuatorianos usados en este estudio no fueron identificados con la provincia de origen.

Se distinguió dos clusters principales, con divisiones significativas dentro de cada cluster. Estas divisiones no fueron inesperadas ya que dentro de las pruebas no se incluyeron un número de carbohidratos para los cuales todas las cepas probablemente hubieran dado la misma reacción. Todos los aislamientos de México evaluados se agruparon en el primer cluster, donde se incluyeron algunas cepas nodulando a más de *P. vulgaris*, *D. leporina* (UMR 1574, 1576, y 1577) y/o *Macropitilium* y *Leucaena* (UMR 1575, 1576, y 1577). Estudios adicionales son necesarios para

agrupar estos microorganismos con aquellos de *Dalea* (Graham et al. 1999) o *R. tropici*, pero es de destacar que las cepas de *R. tropici* usadas como controles, no estuvieron estrechamente relacionadas a los aislamientos de México. El segundo cluster principal estuvo predominantemente compuesto de *Rhizobium* de los Andes (Sur America), pero incluyó una cepa (UMR 1573) de Kenia. Algunos subclusters pequeños fueron evidentes dentro de este segundo cluster, con cepas de las regiones norte (Carchi e Imbabura) y central (Chimborazo y Bolivar) del Ecuador con menos diversidad de los aislamientos de la región sur (Azuay y Loja). Todas las 80 cepas del segundo cluster nodularon *P. vulgaris*, con solo seis aislamientos (UMR 1446, 1449, 1477, 1480, 1489, y 1491) induciendo unos pocos “pseudonódulos” en *Macroptilium*. Estos nódulos fueron muy pequeños y estuvieron distribuidos a lo largo de todo el sistema radicular. Ninguna cepa de los Andes indujo nódulos en *D. leporina*. Los aislamientos pertenecientes a *P. aborigineus* no se agruparon claramente con ninguno de los clusters mayores.

Cuando algunas cepas representativas de los diferentes grupos identificados fenotípicamente fueron sujeto al análisis Box A1R-PCR, y los patrones de bandas de ADN obtenidos fueron analizados mediante componentes principales del programa BioNumerics, las cepas estudiadas se agruparon dentro de cuatro grupos (Fig. 2).

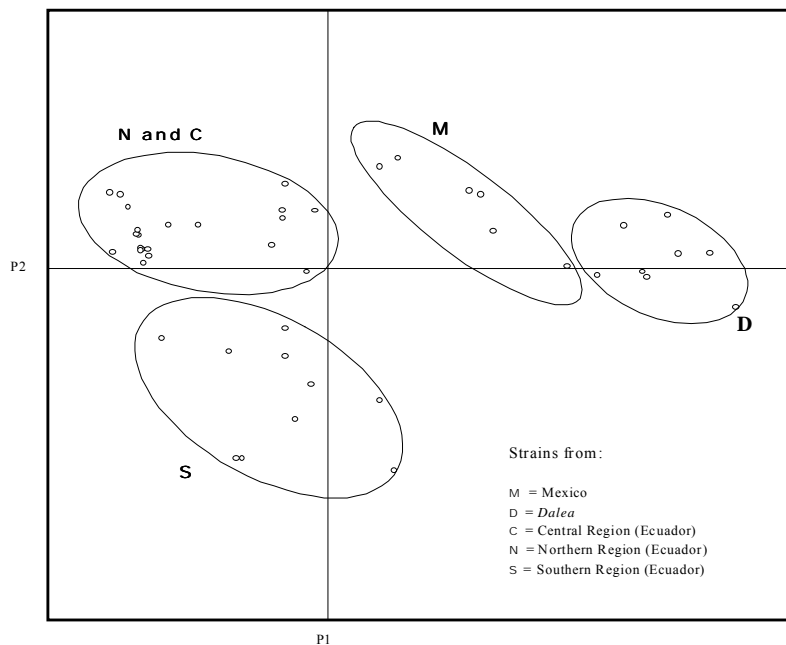


Figura 2. Relaciones genéticas entre *Rhizobium* de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) de las regiones del norte (N), central © y sur (S) del Ecuador y México (M), y *Rhizobium* de *Dalea* nodulando esta leguminosa (D). Se incluyó cepas referencia aisladas de Minnesota. El análisis corresponde a Box A1R usando la opción Componentes Principales del programa Bio-Numeric version 5.1. Las cepas incluidas en los diferentes clusters son: Región norte y centro del Ecuador: UMR1349, UMR1353, UMR1357, UMR1422, UMR1425, UMR1430, UMR1446, UMR1447, UMR1448, UMR1449, UMR1450, UMR1452, UMR1461, UMR1462, UMR1464, UMR1465, UMR1466, UMR1467, UMR1477, y UMR 1581. Region sur del Ecuador: UMR1468, UMR1469, UMR1472, UMR1474, UMR1475, UMR1478, UMR1480, UMR1481, UMR1482, y UMR1575. México: UMR1574, UMR1576, UMR1577, UMR1578, UMR1579, y UMR1580. *Dalea* spp: UMR6815 (muestras duplicadas), UMR6833, UMR6852, UMR6859, UMR6860, UMR6861, y UMR6864.

Estos correspondieron al *Rhizobium* de (i) las regiones norte y central del Ecuador, (ii) la region Sur del Ecuador y norte del Perú, (iii) México, y (iv) aislamientos nodulando *D. leporina*, incluyendo controles de *Dalea* spp., aislados en Minnesota (Graham et al. 1999).

Comparación del *Rhizobium* de fréjol de suelos de México y Ecuador.

Los suelos de las regiones productoras de fréjol en México (Poconichim) y Ecuador (Cotacachi) inoculados en los cultivares de fréjol Puebla 152 (Mesoamerica) y Bolon M6 (Ecuador) no mostraron una diferencia obvia en el conteo del número mas probable (Tabla 2). Sin embargo, la población en el suelo de México usando *Dalea* spp., como hospedero, fue baja. La diversidad genética estimada (DGE) para el *Rhizobium* de fréjol aislado de cada hospedero, fue mas alta en el suelo de Poconichim que en el de Cotacachi. Sorprendentemente, el *Rhizobium* de este suelo, aislado del cultivar Bolon M6 fue genéticamente más diverso que aquellos aislamientos obtenidos del cultivar Puebla 152. La Fig. 3 muestra los resultados Box A1R-PCR de nódulos obtenidos de los cultivares plantados en el suelo de Poconichim. Es notorio que los aislamientos provenientes de *Dalea* evaluados en este estudio no se agruparon con ninguno de los aislamientos de *Phaseolus*. Posiblemente, la población baja en el suelo y la competitividad limitada en la nodulación de *P. vulgaris* pudo haber limitado la contribución del microsimbionte de *Dalea* a la nodulación del fréjol bajo condiciones de campo.

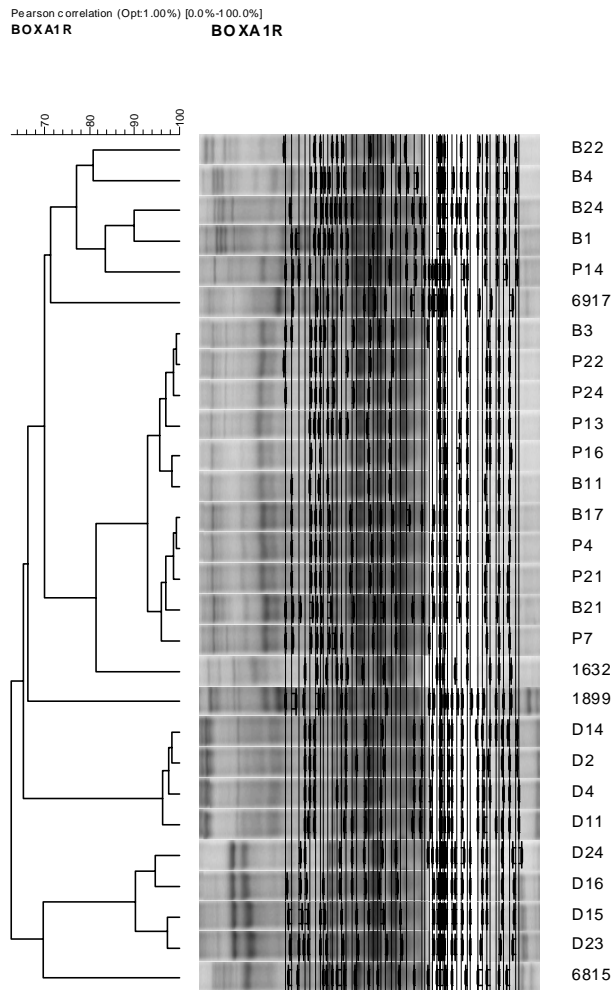


Figura. 3. Dendrograma BOX A1R-PCR mostrando aislamientos obtenidos de *Phaseolus vulgaris* cvs Puebla 152 (P) y Bolon 6 (B), *Dalea leporina* (D14,D2,D4,D11) y *D. aurea* (D24,D16,D15,D23), en asociación con el suelo de Poconichim. Se incluyen las cepas referencia UMR 6917, UMR 1632, UMR 1899 y UMR 6815.

Tabla 2. Numero de células rizobianas (cel/g suelo) y diversidad genética estimada (DGE) entre el *Rhizobium* de fréjol, en suelos de las regiones de Mesoamerica y los Andes.

Suelo / Hospedero	NMP	DGE
¹ Poconichim / 3Puebla 152	6.09 x 10 ⁵	3.29
Poconichim / 4Bolon 6	3.59 x 10 ⁵	3.50 *
Poconichim / <i>Dalea</i>	28	
² Cotacachi / Puebla 152	3.59 x 10 ³	2.56
Cotacachi / Bolon 6	3.36 x 10 ³	2.59

* Diferencia significativa al nivel del 0.001

1 Poconichim-Chinalho, México. pH: 5.8

2 Cotacachi-Imbabura, Ecuador. pH: 6.5

3 y 4 : Cultivares locales de fréjol de México y Ecuador, respectivamente.

Comparación del *Rhizobium* de fréjol aislado de sitios de la región sur del Ecuador.

Todos los conteos del NMP de *Rhizobium* en tres suelos del sur del Ecuador estuvieron en el orden de 10⁵ – 10⁶ bacterias por g de suelo (Tabla 3), independientemente del cultivar usado. Mientras la mayoría de aislamientos en cada suelo aparecieron relacionados marcadamente, la DGE en dos de los tres suelos (Mater y Cañicapac) fue mayor cuando se utilizó un cultivar de fréjol local. Las figuras 4 y 5 muestran los perfiles Box AIR-PCR para los aislamientos aislados de los suelos de Cañicapac y Mater. El agrupamiento de acuerdo al cultivar utilizado es evidente en cada suelo. Ninguna de las cepas de estos suelos se agruparon con las cepas UMR 1899 (*R. tropici*) o UMR 6917 (*R. giardinii*), aunque algunos aislamientos del suelo de Mater mostraron similitud con la cepa UMR 1632 (*R. etli*).

Tabla 3. Números de rizobios (cel/ g suelo) y diversidad genética estimada (DGE) entre el *Rhizobium* de suelos de la región sur del Ecuador.

Suelo /cultivar de fréjol	NMP	DGE
¹ Mangucusana / Cargabello	2.30 x 10 ⁵	3.30
Mangucusana / Bolon (local)	2.30 x 10 ⁵	3.30NS
² Mater / Imbabello	7.81 x 10 ⁵	2.68
Mater / Machete (local)	3.75 x 10 ⁶	2.81*
³ Cañicapac / Imbabello	3.59 x 10 ⁵	3.35
Cañicapac / Bolon (local)	5.46 x 10 ⁵	3.54*

NS Sin diferencias significativas

* diferencia significativa al nivel del 0.001

1 Mangucusana-Cañar, Ecuador. pH: 7.5

2 Mater-Loja, Ecuador. pH: 5.8

3 Cañicapac-Loja, Ecuador. pH:6.5

DISCUSION

Estudios previos sobre la biodiversidad del *Rhizobium* asociado con *P. vulgaris* han enfatizado al centro de origen Mesoamericano, reportando heterogeneidad extensiva (Pinero et al. 1988; Souza et al. 1994). El presente estudio ha mostrado que (i) las cepas de *R. etli* de Mesoamerica muestran separación fenotípica y genotípica del *Rhizobium* asociado con el fréjol de la región Andina de Latino América, con algunas subdivisiones, (ii) el uso de cultivares locales o introducidos puede

influenciar la diversidad genética de las cepas aisladas, y (iii) el *Rhizobium* diferente a *R. etli* en los suelos de Mesomerica puede jugar algún rol en la nodulación del frejol.

La coevolución del hospedero y su microsimbionte podría ser un factor de las diferencias reportado en este estudio entre el *Rhizobium* de Mesoamerica y el de los Andes. La separación de *P. vulgaris* en estos dos centros de origen data a 5000 años (Kaplan 1965; Kaplan et al. 1988), con una incompatibilidad genética ahora evidente entre representativos de ambos acervos genéticos (Singh y Gutierrez,1984). Por lo tanto, es muy probable que un aislamiento a largo plazo de hospederos específicos y su *Rhizobium* en cada centro de origen debería conducir a cierto nivel de especificidad en sus asociaciones. Esto ya se ha evidenciado en estudios previos. Así, Chaverra y Graham (1992),

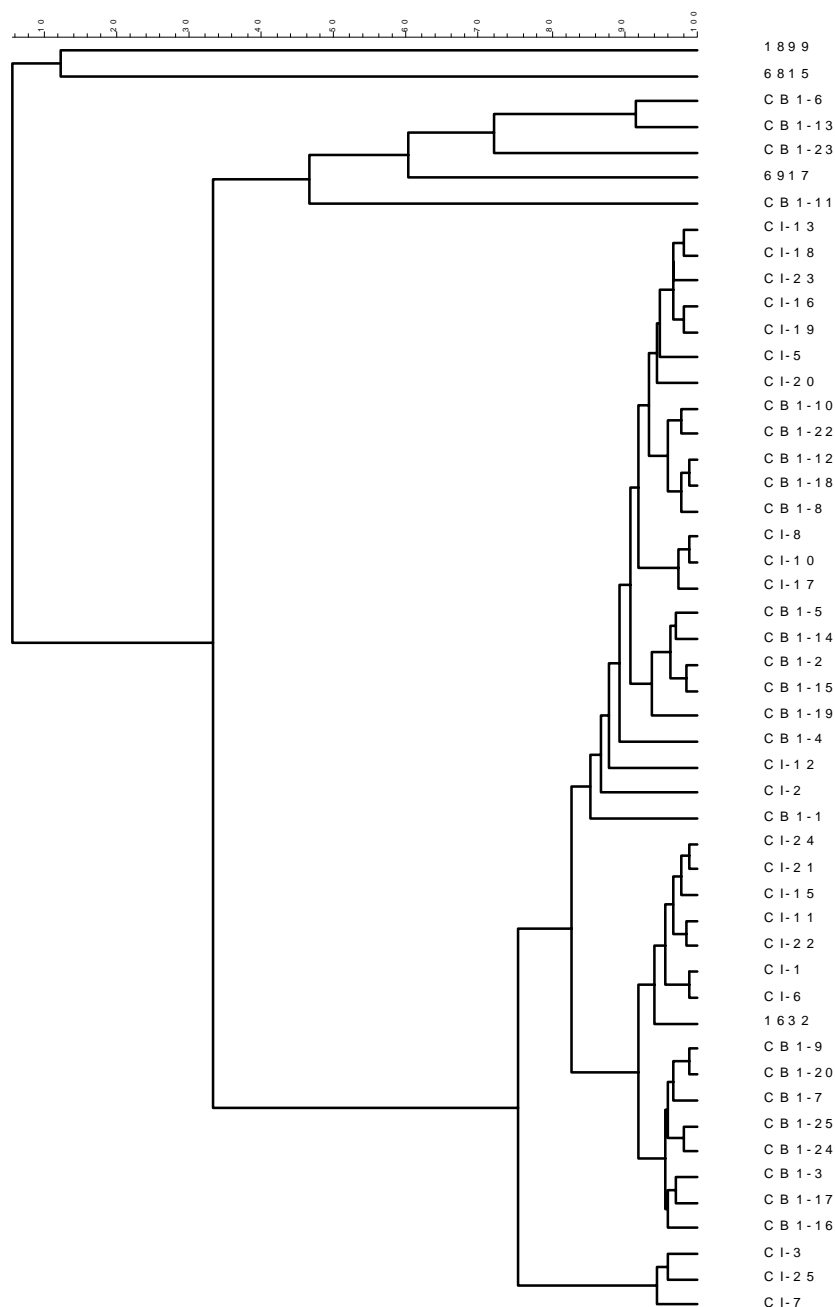


Figura. 4. Dendrograma BOX A1R-PCR mostrando aislamientos obtenidos de *Phaseolus vulgaris* cvs Bolon (local, B1) e Imbabello (introducida, I) cultivados en el suelo Cañicapac (C). Se incluyen las cepas referencia UMR 6917, UMR 1632, UMR 1899 y UMR 6815.

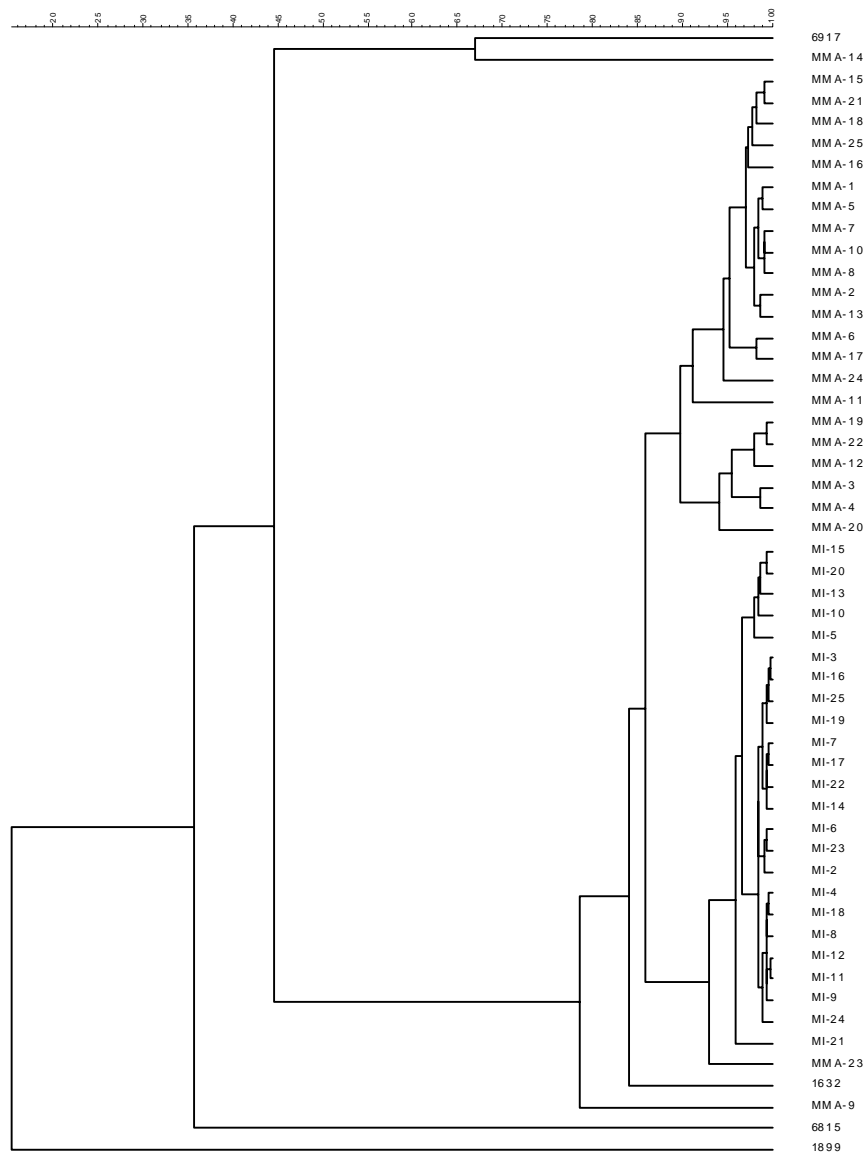


Figura. 5. Dendrograma BOX A1R-PCR mostrando aislamientos obtenidos de *Phaseolus vulgaris* cvs Machete (local, MA) e Imbabello (introducida, I) cultivados en el suelo Mater (M). Se incluyen las cepas referencia UMR 6917, UMR 1632, UMR 1899 y UMR 6815.

y Bernal (1993) reportaron diferencias en la velocidad de la nodulación de cultivares, por parte del *Rhizobium* perteneciente a los dos diferentes acervos genéticos. Bernal (1993) evaluó la velocidad de nodulación de cepas de Ecuador en variedades representativas de los grupos de *P. vulgaris* identificado por Singh et al. (1991), encontrando que los cultivares Mesoamericanos Durango y Puebla 152 eran significativamente más lentos para nodular con estas cepas. Entre los factores que pueden contribuir a la heterogeneidad y a las diferencias en la respuesta simbiótica entre las cepas del Ecuador, está la dependencia local sobre los “landraces”, incluyendo cultivares volubles en lugar de variedades mejoradas, la práctica en el sur del Ecuador de sembrar y mantener mezclas varietales, y la topografía irregular y aislamiento de los valles Interandinos donde el fréjol es un cultivo de subsistencia. Estudios adicionales se requiere para definir de mejor manera la extensión e importancia de la especificidad y la coevolución en esta simbiosis, considerando el modelo del mosaico geográfico de la coevolución propuesto por Thompson (1999).

Las diferencias en el *Rhizobium* asociado a cultivares representativos de los diferentes centros de origen del fréjol, podría tener implicaciones en el campo. Como se describió arriba, tanto Chaverra y Graham (1992), y Bernal (1993) reportaron especificidad entre cultivares de fréjol y su microsimbionte. Cepas Mesoamericanas de *R. etli* también mostraron ser competitivas en relación a la cepa de *R. tropici* UMR 1899 (Martínez y Rosenblueth 1990; Streit et al. 1992; Anyango et al. 1995; Hungria et al. 1997). Aun más sorprendente, una respuesta significativa a la inoculación del fréjol ha sido reportada en el centro de origen Andino del cultivo (Pineda et al. 1994; Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, 2001, no publicado). Tal especificidad podría ser un factor en la percepción del fréjol como pobre en la nodulación y fijación del nitrógeno, lo cual nuevamente exige investigación adicional.

La mayoría del *Rhizobium* de los Andes examinado en este estudio perteneció a la especie *R. etli*. Las cepas mostraron un rango hospedero reducido, nodularon efectivamente solo con *P. vulgaris*, y no toleraron la acidez. Además, las cepas examinadas por Bernal (1993), mostraron las características de reiteración del gene-*nifH* reportado por Martínez et al. (1985). Por el contrario, algunos aislamientos de *Rhizobium* de Mesoamerica estudiados en esta investigación pudieron haberse originado de la bacteria asociada con la leguminosa nativa *Dalea* spp. Este *Rhizobium* ha mostrado ser infectivo y efectivo con fréjol (Martínez et al. 1985). En este estudio, donde la población indígena de *R. etli* fue alta, los organismos asociados con *Dalea* talvez no fueron competitivos con *P. vulgaris*, sin haber indicaciones de un rol significativo en la simbiosis. Esta situación podría ser diferente en Minnesota, donde el fréjol fue introducido relativamente reciente especialmente dentro de áreas de praderas conteniendo *Dalea*, y donde se ha mostrado que semillas cosechadas de fréjol llevan tanto *R. etli* como el microsimbionte de *Dalea* (Graham 2001, información no publicada). Al momento, se están llevando estudios para examinar la importancia del *Rhizobium* diferente a *R. etli* en la nodulación del fréjol cultivado en la región central-norte de los Estados Unidos.

Bibliografía

- Amarger, N., Macheret, V. and Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 996-1006.
- Anyango, B., Wilson, K.J., Beynon J.L. and Giller K.E. 1995. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. Appl. Environ. Microbiol. 61, 4016-4021.
- Barneby, R.C. 1981. New species of *Dalea*. Section Parosela (Leguminosae: Amorphae) from Peru and Mexico. Brittonia 33, 508-511.
- Barneby, R.C. 1988. The genus *Dalea* (Fabaceae Tribe Amorphae) in Departamento de Cajamarca, Peru, with description of three new species. Brittonia 40, 1-6.
- Barneby, R.C. 1990. Two new taxa in *Dalea* (Fabaceae: Amorphae) from Southern Mexico and Northern Chile. Brittonia 42, 89-91.
- Beebe, S., Skroch, P.W., Tohme, J., Duque M.C., Pedraza, F., and Nienhuis J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Sci. 40, 264-273.
- Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Ge. Microbiol. 84: 188-198.
- Bernal, G. 1993. Characterization of Ecuadorian and Argentine bean rhizobia and their specificity with *Phaseolus vulgaris* L. of different gene pools. M.Sc. Thesis, University of Minnesota.

- Chaverra, M.H., and Graham, P.H. 1992. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. *Crop Sci.* 32: 1432-1436.
- Coutinho, H.L.C., Oliveira, V.M., Lovato, A., Maia, A.H.N., and Manfio, G.P. 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl. Soil Ecol.* 13, 159-167.
- Gepts, P., and Bliss, F.A. 1985. F1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. *J. Hered.* 76, 447-450.
- Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S., and Fry, W.E. 1995. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopath.* 85, 669-675.
- Graham, P. H., Ballen, K.G., Montealegre, C., Jones, R.K., Fischer, B., and Luque, E. 1999. Characterization of rhizobia associated with *Dalea* spp. in natural prairies and revegetation areas in Minnesota. In: Highlights of nitrogen fixation research. Martinez, E. and Hernandez, G. (Eds.). pp. 69-75. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Graham, P.H., Viteri, S.E., Mackie, F., Vargas, A.T., and Palacios, A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5, 121-128.
- Hungria, M., Andrade, D.D., Colozzi, A., and Balota E.L. 1997. Interactions among soil organisms and bean and maize grown in monoculture or intercropped. *Pesq. Agropec. Bras.* 32, 807-818.
- Jordan, D. 1984. Family III. Rhizobiaceae, p: 235-244. In: Krieg N. and Holt J. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kaplan, L. 1965. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (Beans). *Econ. Bot.* 19, 358-368.
- Kaplan, L. 1980. What is the origin of the Common Bean?. *Econ. Bot.* 35, 240-254.
- Kaplan, L., Lynch, T. and Smith, C. 1973. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from an intermontane Peruvian valley. *Science* 179, 76-77.
- Koinange, E.M.K., and Gepts, P. 1992. Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. *J. Hered.* 83, 135-139.
- Lange, R.T. 1961. Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of South-Western Australia. *J. Gen. Microbiol.* 61, 351-359.
- Lindstrom, K., and Lehtomaki, S. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50, 277-287.
- Magurran, A. 1988. *Ecological diversity and its measurements*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Mahuku, G.S., Hsiang, T., and Yang, L. 1998. Genetic diversity of *Microdochium nivale* isolates from turfgrass. *Mycol. Res.* 102, 559-567.
- Martinez, E., and Rosenblueth, M. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2384-2388.
- Martinez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., and Cevallos, M.A. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1779-1786.
- Martinez-Romero, E., Segovia, E., Mercante, F.M, Franco, A.A., Graham, P.H., 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.

- McDermott, T.R., and Graham, P. H. 1990. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3035-3039.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C., Luyten, E., and Vanderleyden, J. 1998. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. FEMS Microbiol. Ecol. 26, 193-205.
- Pineda, P., Kipe Nolt, J.A., and Rojas, E. 1994. *Rhizobium* inoculation increases of bean and maize yields in intercrops on farms in the Peruvian sierra. Exp. Agric. 30, 311-318.
- Pinero, D., Martinez, E., and Selander, R.K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2825-2832.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Second Edition.
- Segovia, L., Young, J.P.W., and Martinez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 374-377.
- Singh, S.P., and Gutierrez, J.A. 1984. Geographical distribution of the DL1 and DL2 genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed and their significance to breeding. Euphytica, 33, 337-345.
- Singh, S.P., Gutierrez, J.A., Molina, A., Urrea, C., and Gepts, P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. Crop Sci. 31, 23-29.
- Somasegaran, P., and Hoben, H. 1994. Handbook for rhizobia. Springer Laboaratory, 450 pp.
- Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Capello, R., Gallardo, C., Montoya, J., and Pinero, D. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1260-1268.
- Streit, W., Kosch, K., and Werner, D. 1992. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (*gus*) gene fusions. Biol. Fert. Soils 14, 140-144.
- Thompson, J. 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. Am. Nat. 153, S1-S14.
- Tohme, J., Gonzalez, D.O., Beebe, S., and Duque, M.C. 1995. AFLP Analysis of gene pools of a wild bean core collection. Crop Sci. 36, 1375-1384.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth. Mol. Cell. Biol. 5, 25-40.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15, Blackwell Scientific Publ. pp 164.
- Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M., and Lindstrom, K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of Leguminous trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 104-113.