

# CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE AISLADOS DE *Rhizobium spp.* DE NODULOS DE ARVEJA (*Pisum sativum*) CULTIVADA EN SUELOS DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

**Isozyme characterization of isolates of *Rhizobium spp.* from pea nodules (*Pisum sativum*) cultivated in soils of Nariño department.**

Jesús Romo R.<sup>a\*</sup>, Mabel Tupaz E.<sup>b</sup>, Elkin Belalcazar O.<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Universidad de Nariño. Departamento de Química. Torobajo. [jesusromor@udenar.edu.co](mailto:jesusromor@udenar.edu.co).

<sup>b</sup>Universidad de Nariño. Sección de Laboratorios. [mabchem@gmail.com](mailto:mabchem@gmail.com).

<sup>c</sup>Universidad de Nariño. Programa de Química.

Aceptado Agosto 2016; Publicado en línea Septiembre 2016

ISSN 2256-3830

## Resumen

Se caracterizaron 33 aislados de *Rhizobium spp.* de nodulos de plantas de arveja (*Pisum sativum*) cultivadas en diferentes suelos del departamento de Nariño, mediante la técnica de Electroforesis de Isoenzimas Multilocus (MLEE). Los aislados rizobiales provienen de varios municipios del departamento Nariño: Peñol, Pasto, Yacuanquer, Guaitarilla, Tangua Imués, Funes, Iles, Puerres, Córdoba y Cuaspud Carlosama. Se evaluaron siete sistemas enzimáticos: malato deshidrogenasa (MDH); aspartato deshidrogenasa (ASD); lactato deshidrogenasa (LDH); alanina deshidrogenasa (ALD); peroxidasa (PER1); amilasa (AMI) y catecol-2,3-oxigenasa (C23O), resultando todos polimórficos. Se encontraron altos valores de diversidad genética ( $H = 0.708$ ) como reflejo de la alta variabilidad. Se generó un dendrograma a partir de una matriz de coeficientes de distancias de las muestras estudiadas en el cual no se observa un agrupamiento significativo de los aislados en función de la localidad de aislamiento. El agrupamiento realizado de acuerdo al pH del suelo de donde provenían los aislados, reflejó mejor las relaciones genéticas entre los distintos aislados.

**Palabras Claves:** *Rhizobium spp.*, MLEE, polimorfismo, variabilidad.

## Abstract

Thirty-three (33) isolates of *Rhizobium spp.* nodules of pea plants (*Pisum sativum*) were grown in different soils of the Nariño department by the Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) technique. The rhizobial isolates came from various municipalities of the Nariño department: Peñol, Pasto, Yacuanquer, Guaitarilla, Imués Tangua, Funes, Iles, Puerres, Cordoba, and Cuaspud Carlosama. Seven enzymatic systems were evaluated: malate dehydrogenase (MDH); Aspartate dehydrogenase (ASD); Lactate dehydrogenase (LDH); alanine dehydrogenase (ALD); peroxidase (PER1); amylase (AMI) and catechol-2,3-oxygenase (C23O), all were found to be polymorphic. As a result of the high variability, high levels of genetic diversity ( $H = 0.708$ ) were found. From a distance matrix coefficients of the studied samples, a dendrogram was generated in which no significant clustering of the isolates was ob-

served as a function of the site of isolation. Better genetic relationships between the different isolates were obtained when the clustering was performed according to the soil pH from where the isolates came.

**Keywords:** *Rhizobium spp*, MLEE, polymorphism, variability

---

## 1. Introducción

La deficiencia de nitrógeno asimilable en el suelo es un factor determinante en el desarrollo y productividad de un cultivo, por lo cual es necesario suministrarlo en forma de fertilizante químico. Sin embargo, existe otra forma limpia y económica, poco contaminante de obtener el nitrógeno como es la utilización de plantas leguminosas. Estas plantas se asocian con varios tipos de microorganismos del suelo par fijar nitrógeno atmosférico. El género *Rhizobium* uno de los más importantes en “la fijación biológica”, ya que poseen la maquinaria bioquímica para transformar el nitrógeno atmosférico en ión amonio, una forma molecular asimilable. Se ha estimado que el 50% del nitrógeno fijado en la tierra proviene de las asociaciones *Rhizobium-leguminosa*. [1,2, 3]

El departamento de Nariño (Colombia) es esencialmente agrícola, en donde el cultivo de leguminosas ocupa un lugar destacado en su economía, entre las cuales la arveja (*Pisum sativum*) y el fríjol (*Phaseoli vulgaris*) son especies muy importantes en áreas de minifundio de clima frío [4]. Por tanto, el conocimiento de las poblaciones de *Rhizobium* de suelos del departamento es muy importante, ya que nos permite seleccionar las bacterias mejor adaptadas para llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

Las bacterias del género *Rhizobium* han sido clásicamente estudiadas y caracterizadas en función del rango de hospedador, de las propiedades antigénicas,

de la resistencia a antibióticos, por su contenido total en proteínas, por su efectividad e infectividad, entre otras técnicas; sin embargo, el uso de características fenotípicas para el estudio de *Rhizobium* tiene bastantes limitaciones. Martínez y Caballero [5], afirman que unos pequeños cambios genéticos, pueden causar efectos profundos en el fenotipo, por esta razón, la sistemática basada solamente en el fenotipo puede conllevar a resultados confusos, divergentes y distorsionados.

En el presente estudio se utilizó la técnica MLEE (en español, electroforesis de isoenzimas multilocus), basada en el polimorfismo isoenzimático para

la determinación de relaciones genéticas entre cepas, la cual es una alternativa para la caracterización y estudio de las poblaciones de bacterias del género *Rhizobium* a partir de aislados de nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum*) cultivadas en diferentes suelos del departamento de Nariño, lo cual se constituye en nuestro objetivo de estudio. Eardly *et al* [6] demostraron que en *Rhizobium* existe una variabilidad alélica suficientemente importante, como para poder aplicar esta técnica, la que ha probado ser de gran valor en estudios genéticos tanto en poblaciones naturales como de cultivo [7].

## Metodología.

Se estudiaron 33 muestras de *Rhizobium spp*; aislados y purificados a partir del nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum*), de las localidades de Pasto, El Peñol, Guaitarilla, Tangua, Imues, Yacuanquer, Iles, Funes, Puerres, Cordoba y Carlosama del departamento de Nariño.

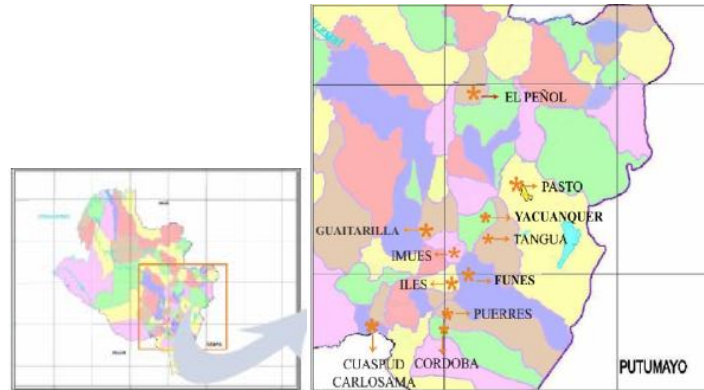
La recolección de los nódulos de las raíces de plantas de arveja, se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Somasegaran y Hoben [8]. Los lugares seleccionados tienen temperaturas medias entre 12 – 14°C y una altitud superior a los 2.200 m (a.s.n.m) (Figura 1). Además, se determinó el pH del suelo del cual fueron tomados los nódulos, de acuerdo a lo reportado por Cano [9].

Para el cultivo y replicación de los aislados de *Rhizobium*, una vez desinfectados se inocularon sobre un medio de levadura-manitol-agar (LMA) + rojo congo. Las colonias típicas de *Rhizobium* se seleccionaron y se replicaron en cajas Petri con LMA hasta obtener cultivos puros. Estos a su vez se conservaron en tubos con agar inclinado y se preservaron desecados en perlas de porcelana [8].

Los extractos proteicos se obtuvieron de los aislados cultivados en medio líquido triptona – levadura (TY) enriquecido con CaCl<sub>2</sub>, hasta obtener una densidad celular aproximada de 10<sup>7</sup> bacterias/ml. Se lisaron las células empleando vidrio molido y lisozima al 1% (MP Biomedicals 100831). La concentración proteica se determinó mediante el método Lowry - modificado descrito por Rosenbrough,

empleando albúmina sérica bovina como patrón [10].

Figura 1. Localidades de muestreo ubicadas en el mapa del departamento de Nariño.



Fuente: Instituto Geografico Aguztin Codazi (Adaptado por esta investigación)

Se analizaron siete (7) sistemas enzimáticos referenciados como polimórficos [11, 12] implicados en vías metabólicas centrales o en vías catabólicas de metabolitos importantes para la bacteria, como: Malato Deshidrogenasa (MDH) (E.C 1.1.1.37); Alanina Deshidrogenasa (ALD) (E.C 1.4.1.1); Aspartato Deshidrogenasa (ASD) (E.C 1.4.3.16); Catecol 2,3 – oxigenasa (C23O) (E.C 1.99.2.a); Lactato Deshidrogenasa (LDH) (E.C 1.1.1.27); Peroxidasa (PER1) (E.C 1.11.1.7) y Amilasa (AMI) (E.C 3.2.1.1).

Las movilidades electroforéticas se determinaron utilizando la técnica de Electroforesis de isoenzimas Multilocus -MLEE-, según Selander [13] y Malik [14], en geles de poliacríamida continuos y discontinuos. Se realizó una electroforesis de corta duración a intensidad variable, inicialmente con intensidad fija de 20mA y después se aumenta a 40mA hasta el final del proceso que puede durar entre 2-3 horas. Las actividades enzimáticas se revelaron mediante tinciones específicas para cada una de las enzimas, basándose en las metodologías descritas por Selander [13], Rius [15] y Martínez-Scott *et.al* [16]. Se determinaron los perfiles isoenzimáticos de cada aislado tomando las movilidades obtenidas para las siete enzimas estudiadas. Se estableció el número 1 para la mayor movilidad y 7 para la menor.

El cálculo de la diversidad genética se realizó con base en el número de variantes, con lo que se determino polimorfismo o tasa de polimorfismo ( $P_j$ ), proporción de loci polimórficos y número promedio

de alelos por locus y con base en la frecuencia de variantes, utilizando el paquete estadístico GENETIX versión 4.05.2 [17]. Con base en la frecuencia de variantes, se calcularon las frecuencias alélicas, diversidad genética por locus ( $h^*$ ) y diversidad genética media ( $H$ ). Se construyó un dendrograma para visualizar las relaciones existentes entre los distintos aislados estudiados, con el método UPGMA (Unweighted Pair – Group Method for arithmetic Averages), mediante el programa PAST 3.05 [18]. Finalmente se calculó el coeficiente de correlación cofenética ( $rc$ ), con el programa NTSYS-pc, versión 2.0 [19].

## Resultados y discusión.

De los 33 aislados de *Rhizobium spp* se determinaron 33 tipos electroforéticos (ETs) que constan de siete alelos representado cada uno por un número, que identifica cada enzima. El número de alelos por locus osciló entre 4 y 7. Todos los loci analizados resultaron polimórficos, lo que se muestra en la tabla de frecuencias (Tabla 1). El número medio de alelos por locus fue 5.43, superior a lo reportado por Ramirez [20] en un trabajo similar donde aparecen de 2 a 6 alelos por locus para cuatro loci, con un promedio de alelos por locus de 3.5.

Los valores calculados de diversidad genética por locus de acuerdo a la ecuación de Nei 1978 (tabla 1) oscilaron entre 0.641 para los loci menos diversos (PER1 y AMI) y 0.785 para los loci mas diversos (C23O y ASD). La diversidad genética media fue 0.708, que es un valor alto en comparación con el

reportado por Ramirez [20].  $H = 0.598$ . Esto indica que existe una mayor diferenciación genética entre los aislados rizobiales del departamento de Nariño, estudiados en esta investigación, pero Martínez-

Scott *et al* [16] han reportado una  $H = 0,846$  para aislados de *Phaseolus vulgaris*.

Tabla 1. Frecuencias alélicas, Diversidad genética por locus y diversidad genética media para la muestra.

ALELO	FRECUENCIAS ALELICAS						
	PER1	AMI	C23O	MDH	ALD	ASD	LDH
1	0.5152	0.0606	0.3333	0.2424	0.0303	0.1212	0.4545
2	0.2121	0.0606	0.1212	0.2121	0.0303	0.1818	0.1818
3	0.0606	0.5152	0.1818	0.4545	0.2727	0.1818	0.1515
4	0.0303	0.2424	0.1515	0.0909	0.1212	0.0303	0.0303
5	0.1818	0.0303	0.1515	-	-	0.2121	0.0606
6	-	0.0606	0.0606	-	-	-	0.0909
7	-	0.0303	-	-	-	-	0.0303
<b>DIVERSIDAD GENÉTICA (h*)</b>	<b>0.641</b>	<b>0.652</b>	<b>0.785</b>	<b>0.671</b>	<b>0.719</b>	<b>0.776</b>	<b>0.715</b>
<b>DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIA (H)</b>	<b>0.78</b>						

La diversidad genética fue calculada para los grupos de aislamiento de acuerdo a las localidades de colección y el pH del suelo del cual fueron aislados. Esta varió en las localidades desde 0.183 que corresponde a Iles hasta 0.525 que corresponde a la localidad de Funes, representando la variabilidad más alta para la muestra estudiada. (Tabla 2)

Al analizar las muestras agrupándolas de acuerdo con el pH del suelo del cual fue aislada la bacteria se observa que existe una relación entre la movilidad electroforética de los alelos y el pH del suelo; así: para PER1, C23O y ASD se observaron un mayor número de formas electroforéticas en el rango de pH 4,7 – 4,9, para las enzimas AMI y LDH en el rango de pH 5,8 – 6,0 y para las enzimas MDH y ALD se evidenciaron dos rangos de pH 4,7 - 4,9 y 5,8 – 6,0 en los cuales se presentaron mayor número de movilidades electroforéticas. Por tanto, se observa que para cada sistema enzimático existe un rango de pH que puede provocar un aumento en la tasa de polimorfismo en el tipo de aislados estudiados.

Para cada locus estudiado existe un rango de pH que favorece el aumento de la diversidad genética; así para PER1, C23O y ASD esta es más alta en el rango de pH de 4.7 – 4.9; para AMI, MDH y LDH se favorece en el rango de 5.8 – 6.0. En estudios realizados por Ramirez [20], Harrison [21] y Mohd – Saud [22] la diversidad genética promedio de los aislados vario de 0.48 a 0.66 para distintos pH del suelo, mostrando valores similares en esta investigación, con diversidades genéticas promedio de 0.403 a 0.582 para pH del suelo (tabla 3)

En trabajos similares empleando el marcador molecular RAPD, se observan patrones diferentes entre los aislados de suelos de distinto pH, lo cual demuestra que las diferencias físicas y químicas de los suelos pueden influenciar, aunque parcialmente, en las diferencias genéticas, mostrando que el pH del suelo es el factor más crítico en el establecimiento de diferencias genéticas entre poblaciones de *Rhizobium leguminosarum*. [23]

Tabla 2. Diversidad genética de *Rhizobium spp* agrupados de acuerdo a la localidad.

LOC.	Nº ETs	Rango pH suelo	DA	PER1	AMI	C23O	MDH	ALD	ASD	LDH	H
				A	A	A	A	A	A		
Yaquanquer	3	5,1-5,3	13	2	3	1	2	1	3	1	0.310
Funes	3	4,7-5,3	17	2	3	2	3	2	3	2	0.525
Imues	3	4,9-5,8	14	2	2	2	2	2	1	3	0.399
Pasto	3	5,8-6,0	13	1	2	1	3	1	3	3	0.310
Peñol	3	6,2-6,4	15	2	1	1	3	3	3	2	0.403
Guaitarilla	3	4,7-5,1	15	2	3	2	2	2	2	2	0.460
Tangua	3	4,9-6,0	16	2	3	2	2	2	3	2	0.493
Córdoba	3	4,7-5,8	14	2	2	1	3	2	2	2	0.399

\* revistafacien@udenar.edu.co  
(jesusromor@udenar.edu.co)

Carlosama	3	4,7-6,0	13	2	2	1	1	2	3	3	0,371
Puerres	3	4,9	13	2	1	3	2	1	3	1	0,310
Iles	3	5,3	10	1	2	2	1	1	1	2	0,183

A: Número de alelos; DA: Diversidad alélica; LC: Localidad; H: Diversidad genética promedio

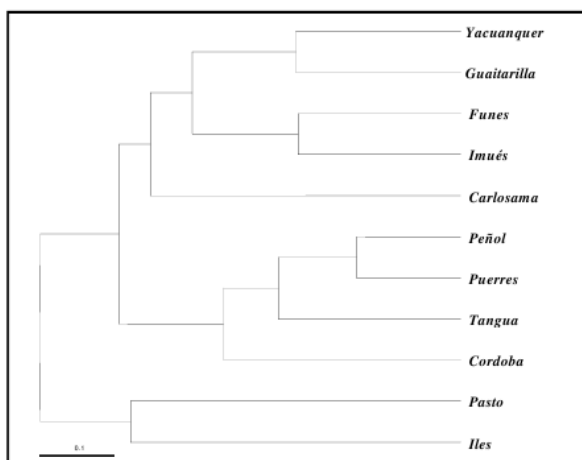
Tabla 3. Diversidad genética de aislados de *Rhizobium spp* agrupadas de acuerdo al pH

Rango pH	PER1		AMI		C230		MDH		ALD		ASD		LDH		PROMEDIO
	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	H
4,7-4,9	5	0,702	4	0,429	5	0,753	4	0,668	3	0,514	5	0,736	2	0,276	0,582
5,1-5,3	2	0,154	4	0,629	4	0,691	3	0,443	2	0,402	4	0,711	3	0,526	0,508
5,8-6,0	3	0,351	5	0,631	4	0,656	4	0,682	3	0,351	3	0,580	4	0,707	0,565

El dendograma construido a partir de una matriz de coeficientes de distancias genéticas, muestra agrupamiento que no exhibe una relación lógica entre las localidades de aislamiento, ya que se esperaría que entre localidades cercanas geográficamente existiera una distancia fenética pequeña (figura 2). Sin embargo el coeficiente de correlación cofenético para el total de la muestra agrupada por localidades de aislamiento fue de 0,667 lo que representa que el 66,7% de la diversidad genética obtenida.

Cuando los aislados se agrupan de acuerdo al pH del suelo del que se tomaron, se observan relaciones entre ellos, lo que significa que el pH es un factor influyente en su estructura genética. El coeficiente de correlación cofenético para el total de la muestra agrupada por pH del suelo fue de 0,850 lo que representa que el 85,0% de la diversidad genética obtenida.

Figura 2. Dendograma de relaciones genéticas entre aislados según las localidades. Coeficiente de correlación cofenético de 0,667.



### Conclusiones

Mediante la técnica de MLEE se evidenciaron 33 tipos electroforéticos o ETs para la muestra estudiada, que exhibe un polimorfismo del 75.3% cuya variabilidad genética promedio es alta. Entre las localidades estudiadas la que presentó mayor variabilidad fue Funes.

La estructura del dendograma sugiere que las relaciones genéticas entre aislados son muy bajas; el coeficiente de correlación cofenético para el total de la muestra agrupada por pH del suelo, representa mejor la diversidad genética observada.

### Referencias

- 1] Díaz, C. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de *rhizobia* autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis doctoral. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Universidad de León, España.
- 2] Cuadrado, B.; Rubio, G.; Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 38 (1), 78-104.
- 3] Paredes, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas>.
- 5] Republica De Colombia. Gobernacion De Nariño. Plan de Desarrollo Departamental. "Nariño

mejor”2012 – 2015 San Juan de Pasto. 30 de abril de 2012.

4] Martínez, E y Caballero, J. 1996. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2:113-140.

6] Eardly, B.; Materon, L.; Smith, N.; Johnson, D.; Rumbaugh, M. y Selander, R. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 187-194.

7] Azofoite-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*. 17(2): 221-242.

8] Somasegaran, P. y Hoben, H. 1985. Methods in Legume - Rhizobium Technology. University of Hawaii NIFTAL Project and MIRCEN. Department of Agronomy and Soil Science Hawaii. Institute of Tropical Agriculture and Human Resources College of Tropical Agriculture and Human Resources.

9] Cano, G. 2011. Manual de Practicas de la Materia de Edafología. Gobierno del Estado de Chiapas, México, 2011.

10] Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A. y Randall, U. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

11] Suárez, Z., Valenzuela, E. M., Mantilla, J., Agudelo, C. 2002. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from nosocomial sources by Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol IV.Nº 2. 58 – 63.

12] Farfán, M. 2002. Estudio de la estructura genética de poblaciones de *Vibrio cholerae*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitaria. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España.

13] Selander R.; Caugant D.; Ochman, H.; Musser, J.; Gilmour, M. y Whittam, T. 1986. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Populations Genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 873 – 884.

14] Malik, S. 2014. Identification Methods | Multilocus Enzyme Electrophoresis. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2da. Edición. 336-343.

15] Rius, N. 2001. Clonal population Structure of *Pseudomonas stutzeri*, a Species with exceptional genetic diversity. *J. Bacterial.* 183, 736 – 744.

16] Martínez-Scott, M., Hernández-Hernández, V., Palomo-Gil, A. y Vásquez-Arroyo, J. 2002. Diversidad Genética de Rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 3(1):9-18.

17] Belkhir, K.; Borsa, P.; Goudet, J.; Chikni, L. y Bonhomme, F. 2004. GENETIX, logiciel sous Window TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier, France.

18) Hammer, Ø.; Harper, D. y Ryan, P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *En: Palaeontologia Electronica*. 2001. vol. 4, no. 1. 9 p. Disponible en: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

19) Exeter Software. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System [programa de computador]. Version 2.1. New York: Applied Biostatistics Inc.,

20) Ramirez, M. 1995. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii*. II. Perfiles de Isoenzimas. *Revista de suelos Ecuatoriales*. Vol. 25, p. 118 – 126.

21) Harrison, S. Jones, D. y Young, J. 1989. Rhizobium population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. *J. Gen. Microbiology*. 135: 1061-1069.

22) Mohd – Saud, B. 1990. Variation in acid tolerance plasmid curing and its effects and electrophoretic types of *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii*. Philosophie Doctor Thesis. University College of Wales, Aberystwyth. U.K.

23) Bastos Da Silva, M., Almeida, H., Barreto, M., Aguiar De Freitas, N., Mergulhao, C. y Pereira De Lyra, M. 2002. Caracterización de aislamientos de rizobios de suelos ácidos y alcalinos en la región semiarida de Pernambuco. *Revista Argentina de Microbiología*. 34. 186 -192.