

## Caracterización de cepas autóctonas de *Bradyrhizobium* sp. aisladas de *Lupinus* spp

Characterization of indigenous strains of *Bradyrhizobium*  
sp (*Lupinus*) isolated from *Lupinus* spp

M. Vielma A.

### Resumen

*Bradyrhizobium* sp. es una bacteria fijadora de nitrógeno que forma nódulos en las raíces de las plantas del género *Lupinus*. Esta leguminosa está ampliamente distribuida en los páramos andinos y las semillas de algunas especies como *L. mutabilis* tienen un alto contenido proteico. *Bradyrhizobium* sp. tiene un gran potencial como inoculante por lo que se trató de caracterizar cepas aisladas de nódulos radicales de *L. mutabilis* y *L. meridanus* usando como criterios: capacidad de nodulación, incorporación de materia seca, resistencia a antibióticos, formación de pigmentos y presencia de plásmidos de alto peso molecular. Gran variabilidad de estas características fueron observadas en las cepas aisladas de ambas especies de *Lupinus*, confirmando una vez más la gran diversidad de las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, estas características específicas pueden ser usadas para seleccionar las cepas 105, 120, 2005, 2006, 2007 y 5017 como las más eficientes y realizar con ellas pruebas como inoculantes en cultivos en el campo.

**Palabras clave:** nódulos, fijación de nitrógeno, plásmidos, resistencia a antibióticos.

### Abstract

*Bradyrhizobium* sp. is a nitrogen fixer bacterium which forms nodules on roots of *Lupinus* genus. This leguminous plant is largely distributed on the Andean paramos, and some species like *L. mutabilis* possess a high proteic content. Great potential as an inoculant is also found in *Bradyrhizobium* sp. For instance, we tried to characterize isolated strains of radical nodules on *L. mutabilis* and *L. meridanus* using the following criterious: nodulation capacity, incorporation of dry matter, antibiotics resistance, pigments formation, and presence of

Recibido el 06-04-1999 • Aceptado el 26-09-1999

Universidad de Los Andes, Fac. de Ciencias, Depto de Biología, Lab. de Cultivos *in vitro*, Núcleo Universitario La Hechicera, Mérida, 5101. Tel. 074-401293, Fax 74-401286. E-mail: mvielma1@ula.ciens.ve

high molecular weight plasmids. Great variability of these characteristics on isolated strains of both *Lupinus* species was observed, confirming again the great diversity of the nitrogen fixer bacterium population. However, these specific characteristic may be used to select more efficient strains such as: 105, 120, 2005, 2006, 2007 and 5017, in order to run tests with them as inoculants in field crops.

**Key words:** nodules, nitrogen fixation, plasmids, antibiotic resistance.

## Introducción

Las bacterias fijadoras de nitrógeno forman parte de la familia Rhizobiaceae, en la cual se encuentran los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* formadores de nódulos radicales con las raíces de las leguminosas. *Rhizobium* forma nódulos en raíces de leguminosas de zonas templadas y *Bradyrhizobium* en leguminosas tropicales y en algunas de zonas templadas (13). La amplia distribución geográfica de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* está relacionada con una gran diversidad genética encontrada cuando se hacen estudios de poblaciones (18). La caracterización de cepas autóctonas de estas bacterias se hace necesario para determinar las más eficientes para los estudios de inoculación ya que las interacciones planta-microorganismos pueden ser altamente específicas y la colección de germoplasma exótico de sitios autóctonos también requiere colección de muestras de rizosfera para el aislamiento de germoplasma bacteriano apropiado (28).

*Bradyrhizobium* sp. forma nódulos en el género *Lupinus*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el Páramo merideño, siendo *L. meridanus* Moritz la especie más representativa (27). Los granos de algunas especies de esta leguminosa

son de gran contenido proteico siendo usados en regiones del altiplano andino como fuente proteica (9, 25). *L. meridanus* (especie autóctona) y *L. mutabilis* Sweet (especie foránea de gran potencial proteico) pueden ser cultivadas extensivamente como plantas pioneras para el enriquecimiento en nitrógeno de los suelos pobres en nutrientes del páramo andino.

En Venezuela no se han realizado aislamientos y caracterizaciones de cepas nativas competitivas de *Bradyrhizobium* sp. que puedan asegurar el éxito como inoculantes para la explotación de este sistema fijador de nitrógeno. En este trabajo fueron aisladas numerosas cepas de *Bradyrhizobium* sp. provenientes de nódulos de *L. meridanus* Moritz y *L. mutabilis* Sweet. Hartman (10) propone hacer una descripción cuantitativa y cualitativa de las poblaciones bacterianas para determinar en que caso el componente bacteriano puede ser limitante para la simbiosis con la leguminosa.

El objetivo del trabajo fue aislar los bradyrizobios de nódulos de *L. meridanus* y *L. mutabilis* y determinar características fenotípicas que puedan servir para definir su eficiencia para ser usadas como inoculantes en

cultivos en el campo. Por lo tanto, la caracterización fue realizada tomando en cuenta propiedades simbióticas como especificidad de huésped, infectividad en su huésped natural y eficien-

cia (10), resistencia a antibióticos (1, 14), presencia de pigmento (2, 5, 12) y presencia de plásmidos de alto peso molecular (4, 6, 7, 8, 16, 21, 22).

## Materiales y métodos

**Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.** Las cepas de *Bradyrhizobium* sp. fueron obtenidas de nódulos de *L. meridanus* y *L. mutabilis* colectadas en la Estación Experimental Mucuchies del FONAIAP, estado Mérida, Venezuela. El aislamiento se realizó según Vincent (29). El crecimiento fue realizado a 28°C, en medio TY (medio con extracto levadura) o en MR (medio *Rhizobium*) (3, 29). Las bacterias usadas en el trabajo se describen, en cuanto a nodulación y formación de pigmento, en el cuadro 1. En el cuadro 2 se listan otras bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* usadas también en el trabajo.

**Resistencia a antibióticos.** Para el análisis de resistencia a antibióticos fueron seleccionadas cepas con diferente capacidad de nodulación y eficiencia (cuadros 1 y 2). Fueron usados antibióticos a diferentes rango de concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ): rifampicina (Rif): 10 -100, cloranfenicol (Cl), 5 -100; sulfato de estreptomina (Sm), 5 -50; vancomicina (Van), 5 -35; espectinomina (Sp), 5 - 40 y ampicilina (Ap), 5- 50; tomando en cuenta resultados de resistencia a antibióticos en *Rhizobium* (1, 14).

**Análisis de nodulación.** Las propiedades simbióticas de las diferentes cepas fueron examinadas en *L. meridanus*. Las semillas esterilizadas superficialmente con hipoclorito de

sodio al 1% durante 15 min y lavadas con agua destilada estéril fueron sembradas en cajas de Petri con medio Jensen e incubadas en la oscuridad a 25°C, y una vez germinadas, se colocaron en tubos Nutman con medio Jensen (29). Diez plántulas con la primera hoja verdadera fueron inoculadas con 2 ml del cultivo bacteriano correspondiente, crecido en TY hasta una DO [densidad óptica a 620 nm de 0,5 ( $10^7 - 10^8$  cel/mL, dependiendo de la cepa)]. Para la inoculación todas las cepas fueron lavadas dos veces con una solución de buffer fosfato, diluido a la mitad. Las plantas crecieron en condiciones de 16 h diarias de luz a 22 °C. El sistema radical fue examinado semanalmente para evaluar la aparición de nódulos. Según Hartman (10) la eficiencia de una cepa está dada fundamentalmente por la cantidad de materia seca producida por las plantas inoculadas y comparada con un control no inoculado; de manera tal, que en este trabajo la eficiencia fue evaluada determinando peso seco de las plantas. Al cabo de 8 -9 semanas los nódulos fueron contados y medidos, y las plantas de cada tratamiento fueron secadas en la estufa a 100 ° C durante 48 h hasta peso continuo. Los nódulos se clasifican de acuerdo al tamaño en grande (Q), mediano (M) y pequeño (P). El número de nódulos ponderados por planta se calculo utilizando la ecuación:  $(\text{NG}+\text{NM}+\text{NP})/\text{Ptas totales}$ ,

**Cuadro 1. Características de cepas de *Bradyrhizobium sp*: nodulación y formación de pigmento.**

Cepa	<i>Lupinus</i>	Nodulación	Pigmentación
5	<i>mutabilis</i>	-	+
505	"	++++	-
102	"		
103	"	-	-
105	"	++++	+
110	"	++	-
113	"	++	-
120	"	++++	-
2004	<i>meridanus</i>		
2005	"	++++	-
2006	"	++++	+
2007	"	++++	+
2011	"	-	-
2012	"	++++	-
3004	"	++++	-
3009	"	++++	-
3010	"	++	-
4008	"	++++	-
4013	"		
4018	"	-	+
5004	"	+	-
5017	"	++++	-

Nodulación: +pocos nódulos, ++algunos nódulos, +++numerosos nódulos, generalmente pequeños, ++++numerosos nódulos grandes y pequeños. - sin nódulo

Pigmentación : +presencia de pigmentos, -ausencia de pigmentos.

**Cuadro 2. Cepas de otras especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.**

Cepa	Genero	Infectividad	Efectividad	Fuente
41	<i>R. meliloti</i>	++	++	INRA.
L5-30	"	+	++	"
B19	"	+	++	INTA.
A16	<i>R. trifolii</i>	+	++	"
2453	<i>Bradyrhizobium</i> sp. *	Nc **	Nc	CIAT

\* Aislado de *Macropitillium* sp.

\*\* No conocida.

donde: NG: Nódulos grandes. NM: Nódulos medianos. NP: Nódulos pequeños.

**Perfil de plásmidos.** El perfil de plásmidos de las cepas bacterianas fue visualizado de acuerdo al método de la lisis alcalina descrito en Maniatis *et al.* (17) y modificado al permitir la

precipitación del ADN en alcohol isopropílico durante 24 h. El estudio se realizó en las cepas 5, 107, 102, 105, 103, 118, 120, 505, 508, 2004, 2006, 2007, 2011, 2012, 4008, 4013 y 4018 de *Bradyrhizobium* sp; en las cepas 41 y L530 de *Rhizobium meliloti* y C58 de *Agrobacterium tumefaciens*.

## Resultados y discusión

**Nodulación y efectividad.** Los resultados de nodulación e incorporación de materia seca son mostrados en los cuadros 1 y 3. Fue calculado el número de nódulos ponderados por el número total de plantas finales de cada tratamiento (Nd.Pd /Nº Pt) y el peso seco de plantas tratadas menos peso seco del control (Ps- Ct).

De las 22 cepas de *Bradyrhizobium* sp. estudiadas, 17 fueron infectivas, mostrando gran variabilidad en esta característica como se muestra en los cuadros 1 y 3. Para determinar las diferencias se analizó la capacidad de nodulación en 21 cepas al igual que el número de nódulos y el peso seco (cuadro 3). El 27,2 % de las cepas no es infectiva y el

número de nódulos fue variable de 4, 6, 10,11, 13, 17, 23, 26, 32 y 46, presentándose éste último con una frecuencia de 4,76 % (cuadro 3). Los números de nódulos 7 y 14 aparecieron con una frecuencia de 9,52 % ambos. Cuando se compara el peso seco de las diferentes cepas (cuadro 3) se observa que la cepa 4018 no es nodulante y tiene menor cantidad de materia seca (8,93 mg) que el control (11,00 mg), lo que puede ser explicado por diferencias intrínsecas de las plantas. La cepa 102 que es nodulante, pero con 10 nódulos pequeños y 1 mediano, acumuló una cantidad de materia seca (13,99 mg) muy cercana al control; posiblemente las características intrínsecas y nódulos ineficientes pueden explicar este comportamiento. Las cepas 3009

y 120 presentan la relación Nd.Pd / N° Pt muy parecidas, pero la acumulación de materia seca y el número de nódulos es muy diferente, indicando una alta efectividad de los 7 nódulos de la cepa 120. Las cepas 3004, 2007 y 105 muestran NdPd / N° Pt similares, pero 3004 acumuló menor cantidad de materia seca. Entre 113 y 505 el incremento de peso seco no es muy grande. La cepa 2006 presenta la mayor acumulación de materia seca (37,22 mg/pt), por encima de 5017 y 2006 y forma el mayor número de nódulos, 46 en total.

No se observa ninguna regularidad entre la capacidad de nodulación (presencia, N° y tamaño de nódulos) y la capacidad de incorporar materia seca en las diferentes cepas. La cepa 3010 con solo 4 nódulos incorpora 22,03 mg de materia seca, mientras la 2006 con 46 nódulos de diferente tamaño incorpora 37,22 mg y la 5017 con 31 nódulos (23 grandes) solo incorpora 37,17 mg de materia seca. Sin embargo, cepas como 2005, 2006 y 2007, todas aisladas de una misma planta, presentan gran cantidad de nódulos y alta eficiencia medida como incorporación de materia seca. Las cepas 2006, 2007, 5004 y 5017 también presentan resistencia a un amplio espectro de antibióticos (cuadro 4) lo cual permitiría la inoculación de estas cepas y un buen rendimiento en la fijación y seguimiento en el suelo en condiciones de laboratorio. La capacidad de nodulación y la eficiencia de una cepa son finalmente el resultado de las interacciones específicas de genotipo bacteriano - genotipo vegetal y de condiciones del medio ambiente que

permiten la expresión de los genes simbióticos. Por lo tanto, en una población de bradirizobios como la estudiada es normal conseguir diferencias de este tipo.

**Resistencia a antibióticos.** El cuadro 4 presenta los patrones de resistencia/sensibilidad a antibióticos de 10 cepas de *Bradyrhizobium* sp. dos de *R. meliloti*, una de *R. trifolii* y una de *R. cowpea*.

Todas las cepas de *Bradyrhizobium* sp., presentan resistencia a más de un antibiótico. Las cepas 2006 y 2007 poseen resistencia a los 7 antibióticos y la cepa 2012 mostró resistencia para los 6 antibióticos examinados; estas cepas fueron aisladas de la misma planta. Las cepas 5004 y 5017 tienen un patrón de resistencia parecido, aunque 5017 no es resistente a rifampicina. Los patrones de resistencia de 105, 110, 3010 y 4017 son muy diferentes entre ellos. Se observan grupos de patrones tales como 2006, 2007 y 2012 con resistencia a rifampicina, cloranfenicol, estreptomina, vancomicina, espectinomicina y ampicilina; la resistencia a kanamicina no fue probada en la cepa 2012. Las cepas 105, 110 y 2004 tienen el mismo nivel de resistencia a espectinomicina, pero 105 y 110 se diferencian de 2004 porque son resistentes a los niveles de cloranfenicol ensayados. La cepa 2004, a pesar de ser aislada de la misma planta que 2006 y 2007, no presenta resistencia a cloranfenicol, kanamicina, vancomicina y ampicilina. En la cepa 3010 no fue probada la resistencia a kanamicina y vancomicina, y la cepa 4017 es sensible a rifampicina, cloranfenicol y vancomicina, siendo resistente solo a espectinomicina. Las cepas 5004 y 5017

**Cuadro 3. Peso seco, tamaño y N° de nódulos, N° de nódulos ponderados/ planta y peso seco trat/ peso seco control de plantas de *Lupinus meridanus* inoculadas con cepas de *Bradyrhizobium* sp.**

Tratamiento	Peso seco (mg)	Tamaño de nódulos			Ndpd/Pt	Incremento de peso seco
		G	M	P		
Control	11,00				0,00	0,00
4018	8,93				0,000	-2,07
102	13,99		1	10	3,000	2,99
2012	16,62				0,000	5,62
2011	16,80				0,000	5,80
5	18,69	-	-	-	0,000	7,69
103	19,63	-	-	-	0,000	8,63
2004	19,82	-	-	-	0,000	8,82
3004	21,57	2	2	3	1,857	10,57
3010	22,03	4	-	-	0,800	10,03
110	24,30	-	-	-	0,000	13,30
4013	24,50	1	-	5	0,889	13,50
3009	28,21	-	3	20	2,189	17,21
5004	28,60	7	2	5		17,60
113	29,03	8	4	5	4,625	18,03
2005	29,35	13	7	6	5,900	18,35
120	30,01	2	1	4	2,400	19,01
505	33,76	13	0	1	4,444	22,76
2007	34,63	-	1	9	1,222	23,63
105	35,02	-	2	11	1,660	24,02
5017	37,17	23	6	3	8,400	26,17
2006	37,22	18	13	15	10,556	26,22

Tamaño de nódulos : G= grande; M= mediano; P= pequeño Ndpd / Pt = N° de nódulos ponderados por planta. Incremento de peso seco: Ps - ct (mg)= Peso seco de la muestra - peso seco del control - = sin nódulos

**Cuadro 4. Niveles de resistencia a varios antibióticos de cepas de *Bradyrhizobium* sp y especies de *Rhizobium*.**

Antibiótico	Rif 10-100 mg/ml	Cl 5-100 mg/ml	Sm 5-50 mg/ml	Km 10-80 mg/ml	Van 5-35 mg/ml	Sp 5-40 mg/ml	Ap 5-50 mg/ml
<b>Cepa</b>							
<i>Bradyrhizobium</i> sp							
105	-	5-10	-	-	-	5-40	5-10
110	-	5-10	-	-	-	5-40	-
2004	-	-	-	-	-	5-40	-
2006	10-20	5-10	5-50	10-80	5-35	5-40	5-50
2007	10-100	5-100	5-50	10-80	5-35	5-40	5-50
2012	20	5-100	5-12	NP*	5-35	5-40	5-50
3010	10	5-10	5-12	-	-	5-40	NP
4017	-	-	NP	NP	-	5	NP
5004	10-100	5-50	5-25	-	5-35	5-10	5-10
5017	-	5-100	5-25	-	5-35	5-40	5-50
Vielma							
<i>R. meliloti</i>							
L530	10-30	5-50	5-50	25	5-35	5-40	5-50
B19	-	5-100	5-50	-	5-35	5-40	25
<i>R. trifolii</i>							
A16	-	5-100	5-50	25	5-35	5-40	5-50
<i>R. cowpea</i>							
2453	20	5-25	5-12	-	-	40	5-10

\* No probado = NP\*

- Ningun crecimiento; Sensibilidad.

son muy parecidas, siendo sensible ambas a kanamicina, 5004 tiene menor nivel de resistencia a cloranfenicol y 5017 es sensible a rifampicina.

A las cepas de *R. meliloti* L530 y B19, *R. trifolii* A16 y *R. cowpea* 2453, se les estudió su patrón de resistencia /sensibilidad a antibióticos para tener una referencia de la posible relación entre infectividad, efectividad, resistencia a antibióticos y su perfil de plásmidos en cepas de *Rhizobium* spp. L530 presentó resistencia a todos los antibióticos, B19 es sensible a rifampicina y kanamicina; A16 se parece a L530, pero es sensible a rifampicina.

Estos resultados son comparables a los observados en poblaciones de *R. phaseoli* (1) y de *R. trifolii* (14), donde cada cepa tiene un patrón de resistencia a antibióticos muy particular, indicando que son una población muy heterogénea. Beynon y Josey (1) observaron 56 tipos de patrones de resistencia en 259 cepas estudiadas.

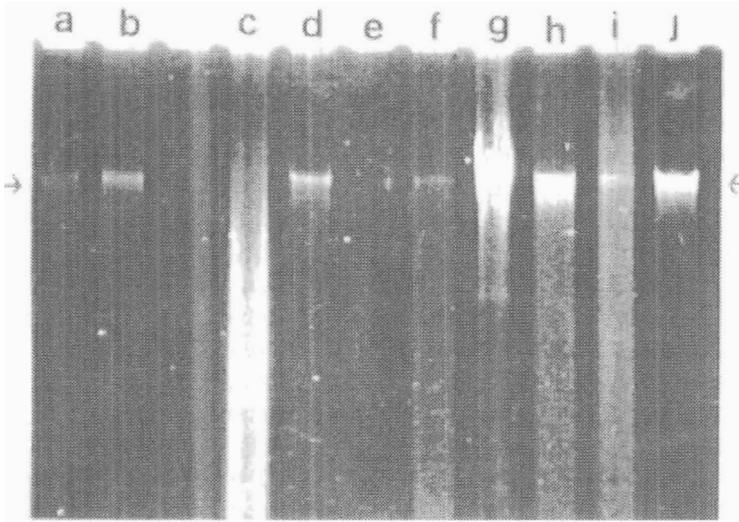
Según Hartman (10) el espectro de resistencia intrínseca a antibióticos pone de manifiesto la gran diversidad genética en las poblaciones de *Rhizobium*, por lo tanto patrones de resistencia a antibióticos en cepas silvestres de *Bradyrhizobium* sp. permiten separarlas entre sí y hacer un seguimiento fácil cuando son inoculadas en el campo.

**Formación de pigmento.** La formación de pigmento pardo durante el envejecimiento se observa en las cepas 5, 105, 2006, 2007 y 4018 (cuadro 1). Este pigmento fue formado en placas de Petri con MR o TY y en tubos con MR. Las cepas 2005 y 2006 formaron pigmento en medios con

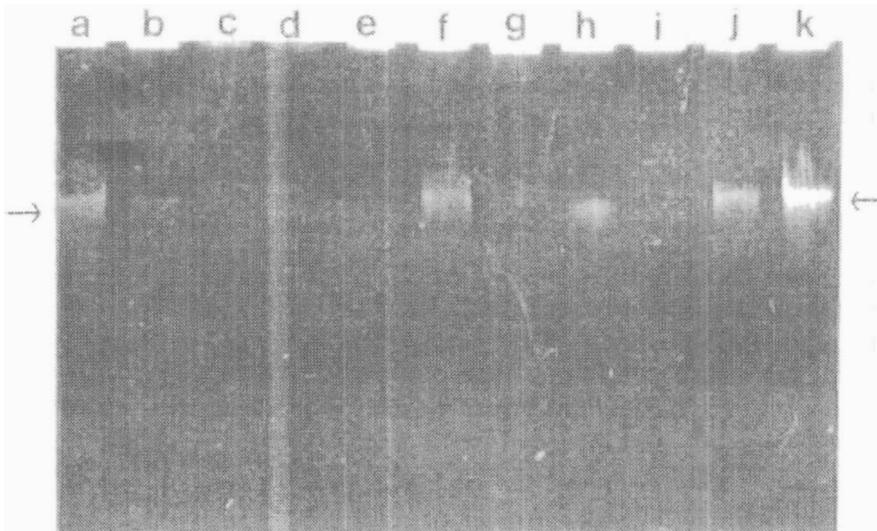
antibióticos. Dada la formación constante de pigmento en estas cepas, esta característica puede ser usada como marcador genético. Numerosas especies bacterianas producen pigmentos como carotenoides y antocianinas cuyos determinantes genéticos se encuentran en plásmidos (2). En *Erwinia herbicola* (5) la presencia de pigmentos está relacionada con un plásmido de 500 kb; en *R. phaseoli* (2) y *R. leguminosarum* (12) genes requeridos para la síntesis de melanina también lo son para la fijación de nitrógeno.

**Perfil de plásmidos.** La evidencia física de la presencia de plásmidos en 17 cepas de *Bradyrhizobium* sp. es mostrada en las figuras 1, 2 y 3. *Rhizobium meliloti* 41, L530 y *Agrobacterium tumefaciens* C58 poseen plásmidos de alto peso molecular. De 17 cepas estudiadas 10 poseen plásmidos. En el género *Rhizobium* los genes simbióticos se encuentran en plásmidos (pSym) (4, 10, 19, 21). Para el caso de las funciones simbióticas en el género *Bradyrhizobium* no se puede asegurar que éstas se encuentren relacionadas con la presencia de material extracromosómico.

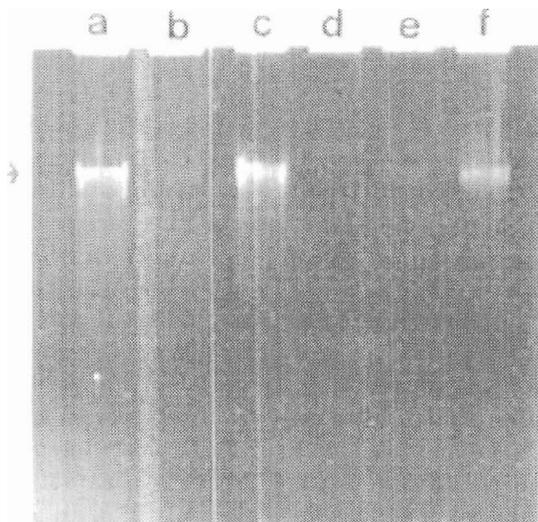
En *B. japonicum* los genes simbióticos están en el cromosoma de manera que la presencia de plásmidos de alto peso molecular en las cepas 107, 105, 103, 118, 120, 2004, 2006, 2007, 2012 y 4008 no se puede relacionar con su capacidad de nodulación y de fijación (20, 24, 26). La cepa 103 presenta un plásmido de peso molecular más bajo (figura 1). Estos plásmidos pueden tener las mismas funciones que en *Azospirillum*



**Figura 1.** Electroforésis en gel de agarosa de aislados de las cepas de *R. meliloti*: (a) 41 y (b) L530; (j) *A. tumefaciens* C58; *Bradyrhizobium* sp.; (c) 5; (d) 107; (e) 102; (f) 105; (g) 103; (h) 118; (i) 120. Las flechas indican la posición de los plásmidos de las cepas de *R. meliloti* 41 y L530 y *A. tumefaciens* C58.



**Figura 2.** Electroforésis en gel de agarosa de aislados de las cepas de *R. meliloti* : (a) 41 y (b) L530; (k) *A. tumefaciens*; *Bradyrhizobium* sp.; (c) 505; (d) 505; (e) 508; (f) 2004; (g) 2006; (h) 2007; (i) 2011; (j) 2012. Las flechas indican la posición de los plásmidos de las cepas de *R. meliloti* 41 y L530 y *A. tumefaciens* C58.



**Figura 3.** Electroforésis en gel de agarosa de aislados de cepas de *R. meliloti*: (a) 41 y (b) L530; *A. tumefaciens* C58 (f); *Bradyrhizobium* sp; (c) 4008; (d) 4013 y (e) 4018. Las flechas indican la posición de los plásmidos de las cepas de *R. meliloti* 41 y L530 y *A. tumefaciens* C58.

(7) y *Enterobacter* (15).

La presencia de plásmidos de alto peso molecular (aproximadamente 200 MD) se puede observar en cepas nodulantes y no nodulantes lo cual confirma una vez más que en el género *Bradyrhizobium* los determinantes genéticos para la nodulación y la fijación de nitrógeno no se encuentran en plásmidos como en el género *Rhizobium*.

Las cepas 102, 103, 105, 107, 118 y 120 son todas aisladas de nódulos de una misma planta de *L. mutabilis* y a excepción de 102 todas presentan plásmidos. Igual sucede con las cepas 2004, 2006, 2007, 2011 y 2012 aisladas de una planta de *L. meridanus*, donde solo 2011 no presenta plásmidos. Lo anterior indica que posiblemente la población de bradyrizobios que ha

infectado a una sola planta, puede originarse de una población base que se ha multiplicado y puede existir pérdidas de material genético plasmídico en algunos de sus miembros.

En las cepas 2006, 2007 y 2012 resistentes a rifampicina también se evidenció la presencia de plásmidos de alto peso molecular (figuras 1 y 2) posiblemente relacionados con la resistencia a rifampicina; en las cepas 3010 y 5004 no se determinó presencia de plásmidos.

Plásmidos de alto peso molecular también están presentes en las cepas de *R. meliloti* L530 (4,5) y B19, *R. trifolii* A16 y *R. cowpea* 2453 (trabajo no publicado) las cuales son infectivas, efectivas y con resistencia a varios antibióticos. Estos plásmidos

están relacionados con la capacidad de fijación (2, 4, 15, 22, 23) y posiblemente con la resistencia a antibióticos como sucede en *R. trifolii* (8).

El pigmento marrón se observó en las cuatro cepas con plásmidos (105, 2006, 2007 y 4018) y en la 5 que no posee plásmidos. Esto contradice lo encontrado en otras especies de bacterias donde la formación de melanina está codificada en un plásmido; sin embargo, es posible que también haya información codificada para la formación de pigmento en otro componente del genoma bacteriano ya que la cepa 5 fue varias veces analizada para determinar la presencia de plásmido y siempre fue negativo el resultado, sin embargo, siempre formó pigmento marrón.

En estudios de poblaciones naturales de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, Hartmann (11) determinó que son

heterogéneas; su diversidad utilizando diferentes métodos de caracterización es importante sin que el nivel de diversidad obtenida por los diferentes métodos sean siempre correlacionados. Este autor confirma que el estudio de cualquier característica en poblaciones de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* pone en evidencia la diversidad de fenotipos simbióticos.

Estos resultados nos llevan a concluir que la población de *Bradyrhizobium* sp. aislada de nódulos de *L. meridanus* y *L. mutabilis* provenientes del páramo merideño, presenta gran diversidad en su capacidad de nodulación, eficiencia, formación de pigmento y presencia de plásmidos de alto peso molecular. Tal diversidad permite seleccionar las cepas más eficientes y con marcadores naturales para ser usadas como inoculantes en el campo.

## Conclusiones

El estudio de cepas de *Bradyrhizobium* spp. aisladas de *L. meridanus* y *L. mutabilis*, ha mostrado que son una población heterogénea con diferencias en su capacidad de nodulación, fijación de nitrógeno, resistencia a antibióticos, formación de pigmentos y perfil de plásmidos. Las cepas 105, 505, 120, 2007, 5017 y 2006, eficientes en la fijación de nitrógeno, medida como incorporación de materia seca, pueden ser usadas como inoculantes en campo y su seguimiento puede realizarse con marcadores como la

resistencia a antibióticos y su perfil de plásmidos.

Estos resultados indican que la población de *Bradyrhizobium* spp. aislada de nódulos de *L. meridanus* y *L. mutabilis* provenientes del páramo merideño, presenta gran diversidad en su capacidad de nodulación, eficiencia, formación de pigmento y presencia de plásmidos de alto peso molecular. Tal diversidad permite seleccionar las cepas más eficientes y con marcadores naturales para ser usadas como inoculantes en el campo.

## Agradecimientos

Al Dr. Manuel Dagert por su colaboración en la visualización de los plásmidos. A la Sra. Beatriz Urrecheaga

por la preparación de los medios de cultivo y al Sr. Sócrates Pérez por la reproducción del material fotográfico.

## Literatura citada

1. Beynon, J. L. and D. P. Josey. 1980. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.* 118: 437-442.
2. Bourthakar, D., J. W. Lamb, and A. W. Johnston. 1987. Identification of ten classes of *Rhizobium phaseoli* gene required for melanin synthesis one of which is required for nitrogen fixation and activities and transcription of the other. *Mol. Gen. Genet.* 207: 156-160.
3. David, M., M. Vielma and J. S. Julliot. 1983. Introduction of IncQ- plasmid into *Rhizobium meliloti*. Isolation of a host-range mutant of RSF1010 plasmid. *FEMS Microbiology Letters* 16: 335-341.
4. Denarié, J., P. Boistard and F. Casse-Delbart 1981. Indigenous plasmids of *Rhizobium*. In: *International Review of Cytology*. Supplement 13. Academic Press Inc. 225-245.
5. Ganlotti, B. V. and S. V. Beer. 1982. Plasmid borne determinants of pigmentation and thiamine prototrophy in *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 151:1627-29.
6. Geniaux, E. and N. Amarger. 1993. Diversity and stability of plasmid transfer in isolated from a single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *FEMS Microbiol. Ecology* 102: 251 - 260.
7. Givadan, A. and R. Bally. 1991. Similarities between large plasmid of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Letters* 78:245-252.
8. Glynn, P., P. Higgins, A. S. Squatini, and F. O'Hara. 1985. Strain identification in *Rhizobium trifolii* using DNA restriction analysis, plasmid DNA profiles and intrinsic antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Letters* 30: 1777-1782.
9. Gross, R. 1982. Chemical characterization of the plants and the seeds. En: Gross, R., and E. S. Bunting (eds.). *Agricultural and Nutritional Aspects of Lupinus*. 570- 583. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Eschborn, 1982.
10. Hartmann, A. 1984. Étude écologique de *Rhizobium meliloti*: composition et distribution d'une population naturelle. Tesis Doctor Tercer Ciclo. Universidad de Dijón. Francia. 52 p.
11. Hartmann, A. 1989. Caractérisation du génoma de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* au niveau moléculaire et son utilisation en écologie microbienne: diversité des populations naturelles et potentiel de transfert de plasmides. Tesis Doctor.. Universidad de Bourgogne. Francia. 145 p.
12. Hawkins, F. K. L., C. Kennedy, and A. W. Johnston. 1991. A *Rhizobium leguminosarum* gene required for symbiotic nitrogen fixation, melanin synthesis and normal growth on certain growth media. *J. of Microb.* 137: 1721-1728.
13. Jordan, D. C. 1984. Rhizobiaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by N.R. Krieg, Baltimore, Maryland. USA .pp 234-256.

14. Josey, P., J. L. Beynon, A. W. B. Johnston, and J. E. Beringer. 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 453-350.
15. Klinmüller, W..1991. Plasmid transfer in natural soil: a case by study with nitrogen fixing *Enterobacter*. *FEMS Microbiol. Ecology.*85:107-116.
16. Lamb., J. W., J. A. Bownie, and A. M. B. Jonston. 1985. Cloning of *Rhizobium phaseoli* and homology to *R. leguminosarum* nod DNA. *Gene* 34: 235- 241.
17. Maniatis, T., E. F. Fristch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 363-369
18. Martínez- Romero, E and J. Caballero-Mellado.1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Science*15(2): 113-140.
19. Meõne-Loccoz, Y. and R. W. Weaver.1995. Plasmid and saprophytic growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii W14-2 in soil. *FEMS Microbiol. Ecology* 18:139-144.
20. Noti, J. D., B. Dudas, and A. A. Szaly.1985. Isolation and characterization of noduling genes from *Bradyrhizobium* sp (*Vigna*) strains IRC78. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 82: 7379 - 7383.
21. Ollero, F., M. R. Espuny, J. Perez-Silva, and R. A. Bellogin 1991 Behaviour of sym plasmid from *Rhizobium 'hedysary'* in different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiol. Ecology.* 86: 131 – 138.
22. Roberts, V. M., P. Russel and A. Atherly.1982. Nitrogen fixation (*nif*) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *J. of Bacteriology* 152: 928 – 931.
23. Rukvum, G. B. and F. M. Auskel. 1980. Inter-species homology of nitrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:191-95.
24. Russel, P. G., K. K. Shell, L. J. Nelson, K. M. Halverson, K.M. Sirotkin, and G. Stacey (1985). Isolation and characterization of the DNA region encoding nodulation function in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. of Bacteriol.* 164:1301-13008.
25. Schõenberger, H., O. Sam, H. D Cremer, I. Elmadfan and R. Gross. 1982. . Protein quality of *Lupinus mutabilis* and its influence trough preparations and supplementation. En: Gross R., and E. S. Bunting (eds.) *Agricultural and nutritional aspects of Lupinus.* 1982.pp. 694 - 705. Eschborn, F. R. G.
26. So, Jae-Sean. A. L. M. Hodyson, R. Haugland, M. Leavitt, Z. Banfalvi. 1987. Transposon induced symbiotic mutants of *Bradyrhizobium japonicum* Isolation of the gene region essentials for nodulation. *Mol. Gen. Genet.* 207:15-23.
27. Vareschi, Volkmar. 1970. Flora de los Páramos de Venezuela. Universidad de Los Andes. Ediciones del Rectorado. Mérida, Venezuela. pp. 141- 143.
28. Van Berkium, P., D. Beyene, G. Bao, T. A. Campbell and B. D. Ecardly. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. Nov. is one of the three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* (L.) Ledebour. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:13 –22.
29. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. *International Biological Programme handbook.* Vol. 15. Oxford. Blackwell Scientific Publishing. 200 p.