

## Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Characterization and genetics identification of *Rhizobium* isolates on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Klever Iván Granda Mora<sup>1</sup>, Ariany Colás Sánchez<sup>2</sup>, René Cupull Santana<sup>3</sup>, Yenisey Gutiérrez Sánchez<sup>2</sup> y Roldán Torres Gutiérrez<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5, Santa Clara. 54830. Cuba.

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

E-mail: roldantg@uclv.edu.cu

**RESUMEN.** El trabajo se llevó a cabo con el objetivo de caracterizar e identificar bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* aisladas de 13 zonas de muestreos de las provincias de Sancti Spiritus, Cienfuegos y Villa Clara. El análisis morfológico se basó en determinar las diferencias de las colonias obtenidas del aislamiento, donde se evaluó la tinción de Gram, tipo de crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación. La identificación genética de los aislados resultantes de la caracterización morfológica se realizó mediante la secuenciación total de los genes de la región 16S ARNr. Los resultados obtenidos demuestran una gran diversidad morfológica de cepas nativas de *Rhizobium* y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en los suelos de la región central de Cuba, obteniéndose 65 colonias iniciales, de las cuales 33 presentaron características diferentes en al menos un parámetro evaluado. De un total de 22 secuencias analizadas en la identificación genética, se obtuvieron 6 géneros bacterianos, siendo el género *Rhizobium* el que mostró variabilidad en las especies, identificándose 4 especies en 8 secuencias alineadas y entre ellas el primer reporte de *R. pisi* para Cuba. Estos resultados demuestran la amplia diversidad genética de especies de *Rhizobium* en la zona central de Cuba, las cuales pueden ser la base para obtención de cepas eficientes para la realización de inoculantes.

**Palabras clave:** Caracterización morfológica, identificación genética, PGPR, *Rhizobium*.

**ABSTRACT.** The work was carried out to characterize and identify bacteria belonging to *Rhizobium* genus isolated from 13 sampling areas in the provinces of Sancti Spiritus, Cienfuegos and Villa Clara. The morphological analysis was based on determining the differences of the colonies obtained from isolation, which evaluated the Gram stain, growth type, color, mucus production, edge and elevation. The genetic identification of isolates resulting from the morphological characterization was performed by gene sequencing of the 16S rRNA region. The results show a wide morphological diversity of native strains of *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in the soils of the central region of Cuba, resulting in 65 initial colonies, from which 33 showed different characteristics in at least one parameter evaluated. From a total of 22 sequences analyzed in the genetic identification, six bacterial genera were obtained, in which the genus *Rhizobium* showed the variability of species. From eight sequences aligned, four species were identified, among them the first report of *R. pisi* for Cuba. These results demonstrate the wide genetic diversity of *Rhizobium* in central Cuba, which can be the basis for obtaining efficient strains for the inoculants performance.

**Key words:** Morphological characterization, genetic identification, PGPR, *Rhizobium*.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas pertenecientes a la familia leguminosa (*Fabaceae*) son unas de las máximas responsables del equilibrio del N en los ecosistemas (Broughton *et al.*, 2003). Estas son capaces de realizar el proceso de fijación

biológica del N (FBN) mediante la estrecha relación con bacterias del suelo comúnmente conocidas como rizobios (Weir, 2006), estableciéndose la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa (Weidner *et al.*, 2003).

El mayor beneficio de la interacción *Rhizobium*-leguminosa está estrechamente ligado a la disminución de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y a la salud de las plantas, lo cual trae como resultado el incremento de los rendimientos agrícolas (Giller, 2001). Estos sistemas simbióticos aportan la mayor fuente de N a los agroecosistemas, incorporando como promedio un 80 % de los requerimientos de N mediante la fijación simbiótica del N (FSN) (Graham y Vance, 2000). Sin embargo, los cultivos de leguminosas son muy variables en cuanto a su eficiencia para fijar dinitrógeno ( $N_2$ ) atmosférico, especialmente el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual se considera por varios autores como ineficiente en este proceso, alcanzando niveles del 40 % del N derivado de la atmósfera (Peña-Cabriales y Zapata, 1999; Urquiaga y Zapata, 2000; Remans *et al.*, 2007; Torres-Gutiérrez, 2008)

Es ampliamente conocido que el frijol común es una leguminosa promiscua en cuanto a la inoculación por cepas de *Rhizobium* (Bromfield y Barran, 1990) una misma planta puede ser infectada por varias especies de este género (Michiels *et al.*, 1998; Torres-Gutiérrez, 2008). Cepas de *Rhizobium* aisladas de nódulos de *P. vulgaris* mediante métodos moleculares (16S rRNA) han mostrado una considerable diversidad genética (Martínez-Romero, 2003; Torres-Gutiérrez *et al.*, 2009), sin embargo, las investigaciones relacionadas con esta temática en las condiciones de los suelos de Cuba son insuficientes, por lo que los objetivos del estudio fueron la caracterización morfológica y la identificación genética de aislados de *Rhizobium* de la región central de Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ensayos en condiciones de laboratorio en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (Cuba), la Universidad Católica de Leuven y la Universidad de Gent (Bélgica). En estas instituciones se realizaron los experimentos necesarios para el aislamiento, identificación y caracterización de los aislados bacterianos procedentes del cultivo de frijol común.

En un total de 13 zonas de muestreo distribuidos por diferentes municipios de las provincias de Villa

Clara, Cienfuegos y Sancti Spíritus, se tomaron muestras de plantas de frijol con presencia de nódulos en las raíces para la realización del aislamiento de las cepas de *Rhizobium* nativas en estos suelos. En todos los casos se tomaron muestras del suelo para la caracterización del grupo pedológico al cual pertenecen.

Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias antes de las 24 h de tomadas para evitar la desecación de los nódulos de las plantas y de este modo obtener bacterias viables. En todos los casos se comprobó la actividad de los nódulos mediante la escisión de los mismos con el objetivo de observar la pigmentación de la leghemoglobina, lo cual indica la viabilidad de los bacteroides dentro del nódulo y, por consiguiente, la vitalidad de estos para el posterior aislamiento.

## Preparación de las muestras y aislamiento de colonias bacterianas

Las muestras se procesaron mediante el método de siembra en placas de Petri y agotamiento por estrías (Torres-Gutiérrez, 2008). Se tomaron aproximadamente de 15 a 20 nódulos (2 g) para realizar la esterilización de los mismos mediante una inmersión de 1 min en etanol (90 %), seguido de 3 min en hipoclorito de sodio (NaClO 3 %) y finalmente 2 min en bicloruro de mercurio ( $HgCl_2$  0,1 %). Después de la esterilización se procedió al lavado intenso de los nódulos (hasta 10 veces) con agua destilada estéril, con el propósito de eliminar todo resto de sustancia tóxica a las bacterias. Luego del lavado se realizó el exudado de los nódulos estériles en 1 mL de agua destilada estéril en placa de Petri.

Las suspensiones obtenidas del exudado en cada muestra se sembró por estrías en placas de Petri con medio agar nutriente (AN) y fueron incubadas a 30 °C durante 7 días. Al finalizar el periodo de incubación, todas las colonias crecidas se purificaron mediante la siembra repetida en medio *yeast-manitol-agar* (YMA) y fue confirmada la pureza de los aislados de *Rhizobium* mediante el suplemento al medio de 0,025 g L<sup>-1</sup> de Rojo Congo o Bromotimol Azul. (Somasegaran y Hoben, 1994)

## Caracterización morfológica

Todas las colonias crecidas procedentes del aislamiento se analizaron como material de origen para la caracterización morfológica. Estas colonias se reinocularon en medio Fred modificado para que existiera disponibilidad de nutrientes, se incubaron a 30 °C durante 24 horas y luego se mantuvieron a 4 °C para detener su crecimiento. La caracterización morfológica se realizó mediante la diferencia de las colonias respecto a: tinción al Gram, tipo de crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación a los cultivos puros de estos aislados posteriormente se les añadió 50 % de glicerol y se mantuvieron a -20 °C para la identificación genética.

## Identificación genética

La identificación genética se realizó mediante las técnicas de biología molecular 16S ADN<sub>r</sub>, específicamente el aislamiento de los genes de la región 16S ARN<sub>r</sub>, la cual es una región muy conservada del genoma de los microorganismos. Esta técnica se basa en el aislamiento del ADN de las colonias, amplificación de los genes de la región 16S ARN<sub>r</sub> y purificación del producto de amplificación, reacción de secuenciación y la secuenciación de estos genes.

El aislamiento del ADN de las colonias aisladas se extrajo mediante el método de lisis alcalina (Vanparys *et al.*, 2007). El procedimiento consistió en la suspensión de 1 o 2 colonias en 20 µl de buffer de lisis (2,5 il 10% SDS; 5 il 1 M NaOH y 92.5 il agua MilliQ) y centrifugado 5 min a 13 000 rpm. El sobrenadante de cada aislado se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* el cual se situó a 95 °C durante 15 min. Subsecuentemente, 180 µl de agua MilliQ se añadieron al tubo y este se centrifugó nuevamente durante 5 min a 13 000 rpm. El nuevo sobrenadante se transfirió a otro tubo *ependorf* y fue desechado, mientras el ADN extraído se conservó y se mantuvo a -20 °C hasta su procesamiento.

Los genes de la región 16S ARN<sub>r</sub> se amplificaron con los cebadores (*primers*) conservados: 5'CTGGCTCAGGAC/TGAACGCTG3' (ARIC/T) y 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' (pH),

los cuales amplifican prácticamente toda la región (1500 pares de bases) correspondiente a los genes 16S ARN<sub>r</sub> (Logan *et al.*, 2000). El producto de la amplificación de los genes 16S ARN<sub>r</sub> se purificó usando el kit de purificación QIAquick (Qiagen, USA), acorde con las instrucciones del fabricante y fue analizado posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Para cada reacción de secuenciación se realizó la mezcla de 1 µl del producto del PCR purificado, 0,5 µl de Big Dye™ *Termination Ready Reaction Mix* (Applied biosystem, USA), 3,75 µl de agua MilliQ y 3 µl (20 ng µl<sup>-1</sup>) de uno de los 8 cebadores usados para la secuenciación total (cebador delantero, posición 339-358, 5'CTCCTACGGGAGGCAGCAGT3'; 519-536, 5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3'; 908-926, 5'AACTCAAAGGAATTGACGG3'; 1093-1112, 5'AGTCCCGCAACGAGCGCAAC3'; cebador reverso, posición 358-339, 5'ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG3'; 536-519, 5'GTATTACCGCGGCTGCTG3'; 1112-1093, 5'GTTGCGCTCGTTGCGGGACT3' and 1241-1222, 5'GCTACACACGTGCTACAATG3'). El programa térmico consistió en 30 ciclos (15 a 96 °C, 1 a 35 °C y 4 min a 60 °C).

El análisis de la secuencia se realizó usando el secuenciador de ADN Applied Biosystem 3100, siguiendo el protocolo del fabricante (Perkin-Elmer). El montaje de las secuencias se realizó con el programa BioNumerics ver. 4.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). El alineamiento de las secuencias, así como la cercanía de las mismas se realizó mediante el programa FASTA (Pearson, 1994) y la homología de las secuencias con las secuencias depositadas en la base de datos de nucleótidos internacional European Molecular Biology Laboratory (EMBL-nucleotide).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un amplio muestreo se llevó a cabo en la investigación para obtener la mayor representatividad de localidades y tipos de suelos de la región central de país. El muestreo se realizó en 13 localidades, abarcó 7 municipios de la provincia de Villa Clara, 1 municipio de la provincia de Cienfuegos y 1 municipio de la provincia de Sancti Spíritus. La tabla

1 muestra la correlación de los tipos y subtipos genéticos de suelos predominantes en las zonas de muestreo con la clasificación internacional.

Como se observa en la tabla, en la gran mayoría de las zonas de muestreos predominó el cambisol eútrico. El análisis realizado respecto a los grupos pedológicos en las zonas de muestreos reviste gran importancia en relación con la microflora autóctona de estas condiciones, ya que además de conocer la

presencia o no de bacterias benéficas en estos, existe una estrecha relación entre las características químicas y físicas de los suelos y la diversidad de microorganismos presentes en las condiciones edafoclimáticas determinadas (Varma y Oelmöler, 2007). Estos resultados demuestran lo reportado por Martínez-Rimero (2003) al señalar que el género *Rhizobium* puede adaptarse a diferentes condiciones agroclimáticas en climas tropicales, encontrándose en una diversa cantidad de tipos de suelos.

**Tabla 1. Zonas de muestreos y clasificación de los suelos predominantes**

Municipio y localidad	Correlaciones	
	Clasificación genética de los suelos de Cuba	FAO-UNESCO (1990)*
Santa Clara (Estación Experimental, UCLV)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Santa Clara (Carretera de Maleza)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Santa Clara (Callejón de los Patos, UCLV)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Cifuentes (Unidad Proletaria)	Ferralítico rojo típico	Ferrasol ródico
Manicaragua (campesino Manicaragua)	Pardo grisáceo	Cambisol Cuarcítico
Jibacoa (La Felicidad)	Pardo grisáceo	Cambisol Cuarcítico
Sagua la Grande (Jesús Menéndez)	Gley Vértico típico	Gelysol vértico
Placetas (campesino Placetas)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Santo Domingo (Manacas)	Ferralítico cuarcítico Amarillo rojizo lixiviado	Acrisol crómico
Santo Domingo (INIVIT)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Camajuaní (campesino Camajuaní)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Cienfuegos (Lajas)	Pardo mullido	Cambisol eútrico
Sancti Spiritus (Cabaiguán)	Pardo mullido	Cambisol eútrico

\*correlación internacional según *World Reference Base* (WRB) (Hernández *et al.*, 2004)

### **Caracterización morfológica de los aislados obtenidos**

Un total de 65 colonias de bacterias se obtuvieron luego del procesamiento de las muestras. Todas las colonias obtenidas formaron parte de la caracterización morfológica, la cual se basó en la diferencia en cuanto a: tinción de Gram, tipo de crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación de las colonias.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en las diferencias morfológicas de los aislados, donde se observa que del total de aislados solo 33 presentaron

características diferentes en al menos un parámetro, aunque todos respondieron a rasgos distintivos del género *Rhizobium* (Segovia *et al.*, 1993). En la tabla se muestran las zonas de muestreo y la cantidad de aislados diferentes obtenidos en dichas zonas, así como las características morfológicas de cada uno de estos. Se destaca que en todos los muestreos realizados se obtuvieron más de un aislado diferente, lo cual demuestra la diversidad morfológica de las bacterias. De un total de 33 aislados el 66,7 % (22) tuvieron morfología de coco-bacilo, mientras que el resto fueron bacilos cortos abundante, siendo característico de este género. Tanto la elevación como los bordes son parámetros muy dependientes

del medio de cultivo, no obstante con la utilización de medio Fred modificado todas las colonias crecieron con elevación y el 66,7 % presentaron bordes regulares.

Tabla 2. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas

Identificador	Parámetros morfológicos						
	Crec. <sup>a</sup>	Color <sup>b</sup>	Mucus <sup>c</sup>	Bordes <sup>d</sup>	Elevac. <sup>e</sup>	Gram <sup>f</sup>	Morfolog.
Santa Clara-Maleza 4	++	3	++	++	+	-	CB
Santa Clara-Maleza 6	++	3	++	+	+	-	CB
Santa Clara-UCLV 1	++	3	++	+	+	-	CB
Santa Clara-UCLV 4	+++	3	+++	++	+	-	CB
Santa Clara-UCLV 5	++	3	++	++	+	-	CB
Manicaragua 1	++	3	++	+	+	-	CB
Manicaragua 3	+++	3	+++	+	+	-	CB
Manicaragua 4	++	3	++	+	+	-	BC
Placetas 4	+++	3	+++	+	+	-	BC
Placetas 5	++	3	++	+	+	-	CB
Cifuentes UBPC 1	++	3	+	++	+	-	BC
Cifuentes UBPC 5	++	3	+	+	+	-	CB
Jibacoa 2	+++	3	++	+	+	-	CB
Jibacoa 5	+++	3	+++	++	+	-	BC
Cienfuegos 2	++	3	++	+	+	-	CB
Cienfuegos 3	++	3	++	+	+	-	BC
Cienfuegos 4	+	3	+	+	+	-	BC
Sagua la Grande 1	++	3	++	++	+	-	CB
Sagua la Grande 3	+++	3	+++	++	+	-	BC
Sagua la Grande 5	++	3	++	++	+	-	CB
Manacas 2	++	3	++	+	+	-	BC
Manacas 4	++	3	++	+	+	-	CB
INIVIT 2	+++	3	+++	++	+	-	CB
INIVIT 3	++	3	++	+	+	-	BC
INIVIT 5	+++	3	+++	+	+	-	BC
Sancti Spíritus 2	+++	3	+++	+	+	-	BC
Sancti Spíritus 3	++	3	++	+	+	-	BC
Santa Clara-Los Patos 1	++	3	++	+	+	-	BC
Santa Clara-Los Patos 5	++	3	++	+	+	-	BC
Camajuaní 1	++	3	++	+	+	-	CB
Camajuaní 2	++	3	++	+	+	-	BC

a/ crecimiento: (-) nulo, (+) ligero, (++) moderado; (+++) abundante; b/ color: (1) transparente (2) traslúcido, (3) opaco, (3\*) blanco opaco, (3\*\*) amarillo opaco; c/ mucus: (-) nulo, (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; d/ bordes: (+) regular, (++) irregular e/ elevación: (+) liso, (++) elevado. Morfología/ BC (bacilo corto), CB (coco-bacilo).

Ambas morfologías pueden encontrarse en la agrupación del género *Rhizobium* (Mayea *et al.*, 1998; Varma y Oelmöler, 2007). En todos los casos se observaron bacterias Gram negativas y coloración opaca, así como el crecimiento de moderado a

### **Identificación genética de aislados mediante el análisis de la secuenciación 16S ADNr**

La técnica de aislamiento y secuenciación de los genes de la región 16S ARNr se aplicó para la identificación genética de las bacterias previamente aisladas y caracterizadas. Esta técnica de biología molecular es extremadamente dependiente de la pureza de las cepas a identificar, de lo contrario la frecuencia de la secuenciación es errónea y se debe repetir todo el proceso (Heyrman y Swings, 2001). Por tal motivo todas las colonias aisladas se re-purificaron obteniéndose un total de 22 aislados los cuales se procesaron siguiendo los protocolos del análisis de secuenciación 16S ADNr.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la secuenciación de los aislados, donde se observa que solamente los aislados obtenidos de Sancti Spiritus (Cabaiguán) no fueron secuenciados debido a la impureza de las bacterias. En el resto de las zonas de muestreos se secuenció al menos 1 aislado. En un total de 22 secuencias alineadas se identificaron 6 géneros bacterianos, resultado inesperado teniendo en cuenta el estricto procedimiento de desinfección de los nódulos realizado, lo que evidencia que aun así, permanecieron rizobacterias provenientes del suelo en la corteza o en el interior de los nódulos. Los resultados demuestran una estrecha homología de las secuencias obtenidas con aquellas alineadas en la base de datos EMBL, lo cual refuerza la hipótesis de la identificación a nivel de género y especie. Según Stackebrandt and Goebel (1994), dos cepas que muestran homología en sus secuencias del 97,5 % o menos, presentan menos del 60 % o 70 % de similitud del ADN y por esta razón no pertenecen a la misma especie.

Como varios de los aislados identificados pertenecen a bacterias gram negativas que se han reportado como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), tales como: *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Rhizobium* (Bai *et al.*, 2003; Dobbelaere, 2002),

podrían ser de gran utilidad para la biofertilización de los cultivos con cepas autóctonas de estas rizobacterias, además de servir como co-inóculos para la aplicación a leguminosas como el frijol común e incrementar los parámetros de crecimiento, nodulación y fijación de N.

Varios son los estudios en los cuales estas rizobacterias han mostrado el incremento de los parámetros de crecimiento y rendimiento de las plantas. Según Andrade *et al.* (1998) el incremento de la nodulación en *Pisum* está relacionado con la inoculación de *P. fluorescens*, mediante la cual se incrementa el exudado de flavonoides por la planta hospedera. En ese sentido Remans *et al.* (2007), reportan que la inoculación de *Rhizobium etli* CNPAF-512 simple y co-inoculado con *Pseudomonas putida* UW4 en variedades contrastantes de frijol común en invernadero mostró un incremento significativo respecto al número de nódulos, masa seca y fijación de N en comparación con el tratamiento testigo y la aplicación de fertilizantes minerales. Wolf *et al.* (2002) han reportado la incidencia de *Stenotrophomonas rhizophila* como una rizobacteria promotora del crecimiento, ya que además de reducir las concentraciones de compuestos cenobióticos en suelos contaminados (Binks *et al.*, 1995), ha sido reportada como biocontrol de agentes fúngicos en los suelos.

### **Diversidad de *Rhizobium* en la región central de Cuba**

Aunque se identificaron varios géneros bacterianos en las muestras de nódulos de frijol, la variabilidad de las especies solo se manifiesta en los aislados pertenecientes al género *Rhizobium*. De 8 secuencias reveladas en este género se identifican 4 especies, demostrando la biodiversidad de este género en la región central del país y en especial en la provincia de Villa Clara. Se destacan los resultados obtenidos en los aislamientos procedentes de los muestreos realizados en Santa Clara (carretera de Maleza y callejón de los Patos) y Camajuaní (área de campesino). En el primer caso aunque el suelo en ambas localidades fue de la misma clasificación y las condiciones agroclimáticas fueron muy similares, se identificaron 2 especies diferentes: *Rhizobium* sp. y *R. etli*, respectivamente.

Tabla 3. Identificación genética de aislados basada en la secuenciación 16S ADNr

Identificador	Zona de aislamiento	Similitud de la secuencias 16S ADNr		Referencia
		FASTA más cercana	%	
R-43435	Cienfuegos (Lajas)	<i>Arthrobacter parietis</i>	96,7	Heyrman et al. (2005)
R-43441	Santa Clara (Estación Exper., UCLV)	<i>Chryseobacterium</i> sp.	100	Vandamme et al. (1994)
R-43452	Jibacoa (La Felicidad)	<i>Chryseobacterium</i> sp.	100	Vandamme et al. (1994)
R-43438	Santa Clara (Estación Exper., UCLV)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissovens</i>	100	Xu (1994)
R-43449	Santa Clara (Estación Exper., UCLV)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissovens</i>	99,9	Xu (1994)
R-43446	Placetatas (campesino Placetatas)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissovens</i>	100	Xu (1994)
R-43448	Santa Clara (callejón de los Patos, UCLV)	<i>Rhizobium</i> sp.	100	Young et al. (2001)
R40981	Santa Clara (carretera Maleza)	<i>Rhizobium etli</i>	99,9	Segovia et al. (1993)
R-43451	Camajuani (campesino Camajuani) 1	<i>Rhizobium etli</i>	99,9	Segovia et al. (1993)
R-43450-T2	Manicaragua (campesino Manicaragua)	<i>Rhizobium radlobacter</i>	100	Young et al. (2001)
R40980	Cienfuegos (Lajas)	<i>Rhizobium pisi</i>	99,9	Ramirez-Bahena et al. (2008)
R40979	Cifuentes UBPC "Unidad Proletaria"	<i>Rhizobium pisi</i>	99,9	Ramirez-Bahena et al. (2008)
R-43444	Camajuani (campesino Camajuani) 2	<i>Rhizobium pisi</i>	99,9	Ramirez-Bahena et al. (2008)
R40982	Sagua la Grande (Jesús Menéndez)	<i>Rhizobium pisi</i>	99,9	Ramirez-Bahena et al. (2008)
R-43440	Cienfuegos (Lajas)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99,7	Wolf et al. (2002)
R-43447	Cienfuegos (Lajas)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99,7	Wolf et al. (2002)
R-43442-T2	Manicaragua (campesino Manicaragua)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	Wolf et al. (2002)
R-43445-T1	Jibacoa (La Felicidad)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99,7	Wolf et al. (2002)
R-43436	Santo Domingo (Manacas)	<i>Pseudomonas montelii</i>	99,9	Elomari et al. (1997)
R-43442-T1	Manicaragua (campesino Manicaragua)	<i>Pseudomonas montelii</i>	99,2	Elomari et al. (1997)
R-43450-T1	Manicaragua (campesino Manicaragua)	<i>Pseudomonas montelii</i>	99,2	Elomari et al. (1997)
R-43453	Placetatas (municipio Placetatas)	<i>Pseudomonas montelii</i>	99,2	Elomari et al. (1997)

Los resultados obtenidos en Camajuaní demuestran un aspecto aun más complejo y ampliamente discutido por la comunidad científica internacional, lo que se refiere a la diferencia de especies de *Rhizobium* provenientes de la misma muestra para el aislamiento.

En este muestreo se identificaron las especies *R. etli* y *R. pisi* procedentes de la misma planta colectada, por lo que se infiere que ambas especies se encontraban co-habitando en el mismo hospedante y por consiguiente puede especularse sobre la formación de nódulos indistintamente por una especie u otra en la misma planta.

Estos resultados son el primer reporte para condiciones cubanas de la presencia de *R. pisi*, así como la incidencia de más de un simbiote co-habitando en los nódulos de la misma leguminosa. Los mismos pueden dar respuesta a la baja eficiencia en la nodulación y fijación de N reportada por varios autores en condiciones de campo (Torres-Gutiérrez, 2004; Torres-Gutiérrez, 2008), debido que al existir varias especies de *Rhizobium* en el mismo nicho de colonización, pueden llevarse a cabo diferentes procesos de reconocimiento de las señales moleculares que excreta la bacteria (genes *Nod*) por la planta y de este modo realizarse un proceso inespecífico, lo cual trae como consecuencia la competencia de las especies por la formación de nódulos, viéndose afectada la fijación de N y la eficiencia de este proceso. (Mulder *et al.*, 2005)

Aunque es ampliamente conocida la promiscuidad de esta planta, parece existir cierta preferencia por diferentes especies de *Rhizobium* (Pacovsky *et al.*, 1984). Se ha considerado que la baja efectividad de la simbiosis *Rhizobium*-frijol se debe a la falta de interacción específica planta-bacteria (Bernal y Graham, 2001). La siembra de frijoles ecuatorianos y mexicanos se ha usado como trampas para la selección de *R. etli* en los suelos, ya que estos pertenecen a los sitios de origen, tanto Andino como Mesoamericano. La eficiencia de la nodulación y la fijación de N fue mayor cuando se utilizaron ambos simbioses de la misma región (Bernal y Graham, 2001). Mientras los cultivares Andinos son capaces de formar un gran número de nódulos con cepas de *R. tropici* (Nodari *et al.*, 1993), cultivares Mesoamericanos con alta

capacidad para fijar N nodulan escasamente con cepas de *R. tropici* y en estos casos *R. tropici* bloquea la nodulación de *R. etli* cuando ambas cepas están inoculadas de conjunto. (Martínez-Romero *et al.*, 1998)

Este hecho pone en evidencia la necesidad de obtener cepas nativas de los suelos en diferentes regiones edafoclimáticas, no solo por la importancia que puede revestir este cultivo, sino además teniendo en cuenta que Cuba se encuentra fuera de los sitios de origen de esta leguminosa.

## CONCLUSIONES

Mediante los análisis morfológicos y genéticos se identifica una alta variabilidad de géneros bacterianos en los suelos de la región central de Cuba, destacándose bacterias diazotróficas y PGPR. Se determinan 4 especies del género *Rhizobium* en 8 secuencias alineadas, dentro de las cuales se encuentran *R. etli*, *R. pisi*, *R. radiobacter* y *R. sp.*, destacándose el primer reporte para las condiciones cubanas de la presencia de *R. pisi* en nódulos de frijol común. Estos resultados brindan una valiosa herramienta para el estudio de las comunidades microbianas en Cuba, así como para determinar las mejores especies de *Rhizobium* específicas para la realización de inoculantes en diferentes localidades de la región central del país.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Lara Ramaeker, Jan Michiels y Jos Vanderleyden, de la Universidad Católica de Lueven, Bélgica, así como a Anne Willems del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gent, Bélgica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade, G.; F. A. De Leij and J. M. Lynch: "Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea". *Lett Appl Microbiol* 26: 311-316, 1998.
2. Bai, Y.; X. Zhou and D. Smith: "Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*", *Crop Sci* 43: 1174-1781, 2003.

3. Bernal, G. and P. H. Graham: "Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia". *Can J Microbiol* 47: 526-534, 2001.
4. Binks, P. R.; S. Nicklin and N. C. Bruce: "Degradation of RDX by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1", *Appl Environ Microbiol* 61, 1813-1822, 1995.
5. Bromfield, E. S. P. and L. R. Barran: "Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*", *Can J Microbiol* 36: 369-372, 1990.
6. Broughton, W. J.; G. Hernandez; M. Blair; S. Beebe *et al*: "Beans (*Phaseolus* spp.), model food legumes", *Plant Soil* 252: 55-128, 2003.
7. Dobbelaere, S.: "The phyto-stimulatory effect of *Azospirillum brasilense*. PhD thesis, KU Leuven, 2002.
8. Elomari, M.; L. Coroler; S. Verhille; D. Izard; and H. Leclerc: "*Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolated from clinical specimens", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 846-852, 1997.
9. Giller, K. E.: "Nitrogen fixation in tropical cropping systems". *CABI publishing*, 423 pp., 2001.
10. Graham, P. H. and C. P. Vance: "Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs", *Field Crops Res* 65: 93-106, 2000.
11. Hernández, A.; M.O. Ascanio; M. Morales y C. Cabrera: "Correlación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba con las clasificaciones internacionales y nacionales: una herramienta útil para la investigación, docencia y producción agropecuaria", 2004.
12. Heyrman, J.; V. Jens; S. Peter; S. Jean and Paul De Vos: "Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (55), 1457-1464, 2005.
13. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana, Cuba, 62 pp.
14. Martínez, E.; M. Flores; S. Brom; D. Romero; y otros: "*Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view", *Plant and Soil* 108: 179-184, 1988.
15. Martínez-Romero, E.: "Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives", *Plant Soil* 252: 11-23, 2003.
16. Mayea, S.; M. Carone; R. Novo; I. Boado; y otros: *Microbiología Agropecuaria*, tomo II, Ed. Félix Varela, La Habana, pp. 156-178, 1998.
17. Michiels, J.; B. Dombrecht; N. Vermeiren; C. Xi *et al*: "*Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation", *FEMS Microbiol Ecol* 26: 193-205, 1998.
18. Mulder, L.; B. Hogg; A. Bersoult and J. V. Cullimore: "Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis", *Physiol Plant* 123: 207-218, 2005.
19. Nodari, R. O.; S. M. Tsai; P. Guzmán; R. L. Gilbertson and P. Gepts: "Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions", *Genetics* 134: 341-350, 1993.
20. Pacovsky, R. S.; H. G. Bayne and G. J. Bethlenfalvay: "Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L", *Crop Sci.* 24, 101-105, 1984.
21. Parsons, R. and R. J. Sunley: "Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signaling particularly in symbiotic systems", *J. Exp. Bot.* 52:435-443, 2001.
22. Peña-Cabriales, J. J. y F. Zapata: *Aumento de la fijación biológica del nitrógeno en el frijol común en América Latina*, Ed. IMPROSA. Irapuato. México, 203 pp., 1999.
23. Ramirez, B.; H. Martha; F. Garcia; P. Paula y otros: Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int Journal Syst Evol Microbiol* 58: 2484-2490, 2008.
24. Remans R.; A. Croonenborghs; R. Torres-Gutiérrez; J. Michiels, and J. Vanderleyden: Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of (*Phaseolus vulgaris* L.), are dependent on plant P nutrition *Eur J Plant Pathol* 119: 341-351, 2007.

25. Segovia, L.; J. P. W. Young, y E. Martínez-Romero: "Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.", *Int J Syst Bacteriol* 43: 374-377, 1993.
26. Somasegaran, P. and H. J. Hoben: Handbook for Rhizobia Methods in Legume *Rhizobium* Technology. Springer-Verlag, New York, p. 450, 1994.
27. Torres-Gutiérrez, R.: Phytoestimulatory effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. Dissertaciones de Agricultura. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven, 155 pp., 2008.
28. Torres-Gutiérrez, R.; C. Pérez y Norma Canino: Increments of biological nitrogen fixation by means of combined inoculation of atmospheric fixation bacterias. 6<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference. 24-28 July. Toulouse, France, P6.12: 109. 2004.
29. Torres-Gutiérrez, R.; R. Remans; A. Willems; G. Hernández *et al.*: Morphological characterization and genetic identification of rhizobacteria in cuban agricultural soils. XXIV reunión latinoamericana de rizobiología, La Habana, 5-9 de mayo, Cuba, 2009.
30. Urquiaga, S. y F. Zapata: Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe, Ed. GENESIS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 88 pp., 2000.
31. Vandamme, P.; J. F. Bernardet; P. Segers; K. Kersters and B. Holmes: "New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom". rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 827-831, 1994.
32. Vanparys, B.; E. Spieck; K. Heylen; L. Wittebolle *et al.*: "The phylogeny of the genus *Nitrobacter* base on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrate oxidoreductase gene sequence analysis". *Syst Appl Microbiol* 30: 297-308, 2007.
33. Varma, A. and R. Oelmüller: Advanced Techniques in Soil Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. ISBN-978-3-540-70864-3, 427 pp., 2007.
34. Weidner, S.; A. Puhler and H. Kuster: Genomics insights into symbiotic nitrogen fixation. *Curr Opin in Biotech* 14: 200-205, 2003.
- Weir, B. S.: The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>, 2006.
35. Wolf, A.; A. Fritze; M. Hagemann and G. Berg: "Stenotrophomonas rhizophila sp. nov., a novel plant-associated acterium", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1937-1944, 2002.
36. Young, J. M.; L. D. Kuykendall; E. Martínez-Romero *et al.*: A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:89-103, 2001.

Recibido: 07/06/2009

Aceptado: 15/09/2009