

DETERMINACION DE PERFILES ISOENZIMATICOS
EN *Rhizobium spp.* AISLADOS DE SUELOS DEL
DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ELKIN EUDORO BELALCAZAR OBANDO
MABEL MARGARITA TUPAZ ENRIQUEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PASTO
2006

DETERMINACION DE PERFILES ISOENZIMATICOS
EN *Rhizobium spp.* AISLADOS DE SUELOS DEL
DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ELKIN EUDORO BELALCAZAR OBANDO
MABEL MARGARITA TUPAZ ENRIQUEZ

Trabajo de grado para optar al título de
Químico

Director
M.Sc JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PASTO
2006

Nota de Aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, 1 de marzo del 2006

A Dios... mi motivación diaria
A mis padres Eudoro y Genith,
Por su apoyo incondicional
A mis hermanas Dayra y Gishella
A mi sobrina Xilenna
A Leidy por su comprensión y ayuda.
Elkin.

A mi madre Mariana[†] con un profundo agradecimiento,
Mi padre Héctor y mi Hermana Carolina,
Por su continuo apoyo
Todos mis familiares
Por la confianza depositada.
Mabel

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a las siguientes personas y entidades que de alguna u otra manera colaboraron con el desarrollo de esta investigación.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

JESUS ROMO RAMOS, M.Sc. en Bioquímica y director de la investigación, por sus valiosas orientaciones.

ERNESTO LUQUE TURRIAGO, Químico profesor de la Universidad San Martín, por su constante motivación para la culminación de este trabajo.

PABLO FERNANDEZ IZQUIERDO, Biólogo profesor de la Universidad de Nariño, por sus oportunos y acertados consejos.

JUAN JOSE LOZADA, M.Sc. en Química Analítica profesor de la Universidad de Nariño, por su valiosa colaboración en la consecución de recursos económicos.

SUSANA CALPA, SANDRA ESPINOZA, RUBIELA CORAL, PIEDAD REBOLLEDO, MARIA DEL ROSARIO CARREÑO, GERMAN CHAVES.

Y a todos y cada una de las personas que de alguna manera contribuyeron a llevar cabo esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
2. MARCO TEORICO	19
2.1 VARIABILIDAD GENETICA DE POBLACIONES	19
2.1.1 Variabilidad genética en bacterias	20
2.1.2 Electroforesis de isoenzimas multilocus	21
2.2 BACTERIAS DEL GENERO RHIZOBIUM	25
2.2.1 Características generales de las colonias	25
2.2.2 Estudios de biodiversidad	26
2.2.3 Metodologías usadas para la caracterización de Rizobios	26
3. METODOLOGIA	28
3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA BACTERIA	28
3.1.1 Determinación del pH del suelo	28
3.1.2 Aislamiento de <i>Rhizobium</i> desde el nódulo	28
3.1.3 Regeneración de cultivos a partir de perlas de porcelana	30
3.2 DETERMINACIÓN DE PERFILES ISOENZIMÁTICOS	31
3.2.1 Obtención de extractos proteicos	31
3.2.2 Preparación de los geles de poliacrilamida	33

	Pág.
3.2.3 Desarrollo de la electroforesis	35
3.2.4 Sistemas enzimáticos estudiados	38
3.2.5 Tinción de los geles	40
3.2.6 Lectura de los geles	44
3.3 DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA	44
4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	47
4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA BACTERIA	47
4.2 DETERMINACION DE PERFILES ISOENZIMATICOS	47
4.2.1 Obtención de los extractos citoplasmáticos	47
4.2.2 Tinción y lectura de los geles	50
4.2.3 Tipos electroforéticos detectados	51
4.2.4 Movilidad de electromorfos	52
4.3 DETERMINACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA.	56
4.3.1 Variabilidad alélica por locus	56
4.3.2 Diversidad genética	58
4.3.3 Representación gráfica de los resultados MLEE	61
5. CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67
ANEXOS	76

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Especies bacterianas estudiadas con la técnica MLEE	23
Tabla 2. Número de muestras y su procedencia	28
Tabla 3. Composición de geles continuos	33
Tabla 4. Composición de geles discontinuos	34
Tabla 5. Tipo y dureza del gel empleado según el sistema enzimático estudiado	35
Tabla 6. Condiciones optimizadas de electroforesis de corta duración	38
Tabla 7. Clasificación de las enzimas	38
Tabla 8. Relación de aislados estudiados con la técnica MLEE	47
Tabla 9. Concentración proteica de los extractos citoplasmáticos	49
Tabla 10. Perfiles de isoenzimas obtenidos para cada uno de los aislados	52
Tabla 11. Variabilidad alélica obtenida con la técnica MLEE	57
Tabla 12. Frecuencias alélicas para el total de la muestra estudiada (33 ETs)	57
Tabla 13. Diversidad genética por locus y diversidad genética media para la muestra	58
Tabla 14. Diversidad genética de <i>Rhizobium spp</i> agrupados de acuerdo a la localidad	59
Tabla 15. Diversidad genética de aislados de <i>Rhizobium spp</i> agrupadas de acuerdo al pH	59
Tabla 16. Comparación de los valores de diversidad genética media	60

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Localidades de muestreo ubicadas en el mapa del departamento de Nariño	29
Figura 2. Regeneración de Cultivos Desecados.	31
Figura 3. Obtención de los extractos proteicos.	33
Figura 4. a. Preparación de un gel de poliacrilamida	36
Figura 5. Desarrollo de la Electroforesis	37
Figura 6. Curva de calibración para densidad celular.	48
Figura 7. Curva de calibración para determinación de proteína	49
Figura 8. Actividad de la enzima peroxidasa. (PER1)	50
Figura 9. Actividad de la enzima amilasa (AMI)	50
Figura 10. Actividad de la enzima catecol,2-3,oxigenasa (C23O)	50
Figura 11. Actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH)	50
Figura 12. Actividad de la enzima alanina deshidrogenasa (ALD)	51
Figura 13. Actividad de la enzima aspartato deshidrogenasa (ASD)	51
Figura 14. Movilidad de electromorfos para la enzima peroxidasa.	53
Figura 15. Movilidad de electromorfos para la enzima amilasa.	53
Figura 16. Movilidad de electromorfos para la enzima catecol 2,3 oxigenasa	54
Figura 17. Movilidad de electromorfos para la enzima malato deshidrogenasa.	54
Figura 18. Movilidad de electromorfos para la enzima alanina deshidrogenasa.	55
Figura 19. Movilidad de electromorfos para la enzima aspartato deshidrogenasa.	55
Figura 20. Movilidad de electromorfos para la enzima Lactato deshidrogenasa.	56
Figura 21. Dendograma de relaciones genéticas entre los 33 ETs.	62
Figura 22. Dendograma de relaciones genéticas entre aislados según las localidades.	63
Figura 23. Dendograma de relaciones genéticas entre aislados según el pH del suelo.	64

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Lista de los géneros y especies de rizobios aprobados hasta el año 1996	71
Anexo B. Lista de géneros y especies propuestos en el período de 1997 hasta el 2001	71
Anexo C. Médios de cultivo.	72
Anexo D. Soluciones y tampones	72

ABREVIATURAS

% Porcentaje
°C Grado Celsius
µl Microlitro
1/4 Una cuarta parte
3/4 Tres cuartas partes
a.s.n.m Altura Sobre el Nivel del Mar
AMI Amilasa
Aprox. Aproximadamente
ASD Aspartato Deshidrogenasa
C23O Catecol 2,3 – oxigenasa
CLM Caldo Levadura - Manitol
cm centímetro
csp. Cantidad suficiente para
EDTA Ácido etilendiaminatetracético
ET Tipo electroforético
etc. Etcétera
FBN Fijación Biológica de Nitrógeno
Fig. Figura
g gramo
h hora
HCl Ácido clorhídrico
KH₂PO₄ Fosfato monobásico potásico
L Litro
LMA Levadura – Manitol – Agar
LMA + RC Levadura – Manitol – Agar + Rojo Congo
LPS Lipopolisacárido
M Molar
mA Miliamperio
MDH Malato Deshidrogenasa
MLEE Multilocus Enzyme Electrophoresis
MTT Dimetiltiazol Tetrazoilo
NAD⁺ Nicotianamida Dinucleótido
NADP⁺ β-Nicotianamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaH₂PO₄ Fosfato monosódico
NaOH Hidróxido sódico
PAGE Electroforesis Vertical en Gel de Poliacrilamida
PER1 Peroxidasas
pH Concentración del ion H⁺ en solución.
PMS Metosulfato de fenazina
PSA Persulfato de Amonio

rpm Revoluciones por minuto
s segundo
TE - NADP Tampón Tris – EDTA NADP
Tris Tris-[hidroximetil]-aminometano
TY Triptona - Levadura
V Voltio
V/V Volumen por volumen
W/W Peso por peso

RESUMEN

La técnica de Electroforesis de Isoenzimas Multilocus (MLEE) permite el estudio de perfiles de isoenzimas en bacterias. La movilidad de las formas electroforéticas esta directamente relacionada con la variación alélica de los genes que codifican proteínas y por esta razón este marcador genético puede ser medido. Esta técnica puede ser utilizada en la identificación y caracterización de aislados rizobiales provenientes de los siguientes municipios del departamento Nariño: Peñol, Pasto, Yacuanquer, Guaitarilla, Tangua Imués, Funes, Iles, Puerres, Córdoba, y Cuaspud Carlosama. Siete enzimas son evaluadas; malato deshidrogenasa (MDH), aspartato deshidrogenasa (ASD), lactato deshidrogenasa (LDH), alanina deshidrogenasa (ALD), peroxidasa (PER1), amilasa (AMI) y catecol-2,3-oxigenasa (C23O); en un total de 33 aislados de *Rhizobium spp.* Todos los loci fueron polimórficos y del total de aislados se observaron igual número de tipos electroforéticos.

La diversidad genética de los aislados se calculó de acuerdo con la localidad y el pH del suelo del cual fueron tomadas las muestras. Se determinaron altos valores de diversidad genética ($H = 0.708$) como reflejo de la alta variabilidad tanto de las formas electroforéticas como de los tipos electroforéticos. Se generaron dendogramas a partir de una matriz de coeficientes de distancias de la muestra estudiada. No se encontró un agrupamiento significativo de los aislados en función de la localidad de aislamiento. En relación al dendograma generado de acuerdo al pH del suelo se observó que es el que mejor refleja las relaciones genéticas entre los distintos aislados.

Palabras Claves: ***Rhizobium spp.***, isoenzimas, malato deshidrogenasa (MDH), aspartato deshidrogenasa (ASD), lactato deshidrogenasa (LDH), alanina deshidrogenasa (ALD), peroxidasa (PER1), amilasa (AMI) y catecol-2,3-oxigenasa (C23O), PAGE, MLEE, polimorfismo, diversidad genética, dendograma.

ABSTRACT

The technique of Multilocus Isoenzyme Electrophoresis (MLEE) allows the study of isoenzyme profiles in bacteria. The mobility of electromorphs is directly related with the allelic variation of genes encoding proteins and then this genetic marker can be measured. This technique can be used in the identification and characterization of strain of *Rizobium* coming from the following municipalities of the department Nariño: Peñol, Pasto, Yacuanquer, Guaitarilla, Tangua Imués, Funes, Iles, Puerres, Córdoba, and Cuaspud Carlosama. Seven enzymes are evaluated; malate dehydrogenase (MDH), aspartate dehydrogenase (ASD), lactate dehydrogenase (LDH), alanyne dehydrogenase (ALD), peroxidase (PER1), amylase (AMI) and catecol-2,3-oxygenase (C23O); in an strain total of 33 of *Rhizobium spp*. All the loci were polymorphic and of the total of strain were observed same number of electrophoretic types.

The genetic diversity of strains was calculated of agreement with the town and the pH of the floor of which the samples were taken. High values of genetic diversity were determined ($H = 0.708$) like reflect of the much high variability in the electromorphs like of the electrophoretic types. Dendogram was generated starting from a matrix of coefficients of distances of the studied sample. It wasn't a significant cluster of the strains in function of the isolation town. In relation to the dendogram generated according to the pH of the floor it was observed that it is the one that better reflective the genetic relationships among the differents strain.

Keywords: ***Rhizobium spp***, isoenzyme, malate dehydrogenase (MDH), aspartate dehydrogenase (ASD), lactate dehydrogenase (LDH), alanyne dehydrogenase (ALD), Peroxidase (PER1), amylase (AMI) and catecol-2,3-oxygenase (C23O), PAGE, MLEE, polymorphic, genetic diversity, dendogram.

INTRODUCCION

Nariño es un departamento esencialmente agrícola en donde el cultivo de leguminosas ocupa un lugar destacado en su economía. Entre ellas, las leguminosas de grano, son productos de consumo común en la dieta del pueblo colombiano. La arveja (*Pisum Sativum*) y el fríjol (*Phaseoli Vulgaris*) son especies muy importantes en áreas de minifundio de clima frío, por la utilización de una alta cantidad de mano de obra y como generadoras de ingresos para un gran número de familias campesinas¹. Además, desde el punto de vista nutricional, las leguminosas son los vegetales con el mayor contenido de proteína y el más bajo requerimiento de fertilizantes².

La deficiencia de nitrógeno asimilable en el suelo es un factor determinante en el desarrollo y productividad de un cultivo; por esta razón generalmente es necesario suministrarlo en forma de fertilizante químico. Sin embargo, con las leguminosas existe otra forma limpia y económica, poco contaminante de obtener el nitrógeno: "la fijación biológica". Para ello las leguminosas deben asociarse con microorganismos del suelo del género *Rhizobium*, estas poseen la maquinaria bioquímica para transformar el nitrógeno atmosférico en ión amonio, una forma asimilable para las plantas.

Estas bacterias 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; sin embargo, el uso de características fenotípicas para el estudio de *Rhizobium* tiene bastantes limitaciones. Martínez y Caballero (1996), 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.

Este problema ha impulsado la aplicación de metodologías alternativas y más específicas, como son las basadas en el polimorfismo isoenzimático para la determinación de relaciones genéticas entre cepas (MLEE, "multilocus enzyme electrophoresis"), o técnicas moleculares para detectar diferencias genómicas intrínsecas de la población estudiada.

La técnica MLEE detecta las variaciones en la secuencia de aminoácidos que afectan a la movilidad electroforética de enzimas metabólicas. Se basa en someter a electroforesis, en condiciones no desnaturizantes, los extractos crudos citoplasmáticos de los individuos a estudio, y seguidamente, teñir los geles para detectar la actividad enzimática de una única proteína. Eardly & Selander; demostraron que en *Rhizobium* existe una variabilidad alélica suficientemente importante, como para poder aplicar la técnica MLEE a la caracterización y estudio de las poblaciones de un suelo.

¹ OSORIO, B.J., 1989. Situación actual de la producción de arveja, haba, garbanzo y lenteja en Colombia. 1989.

² JOLY C., Biological nitrogen fixation within FAO agricultural production programmes in the context of sustainable development. Rome. 1991

Es importante ampliar el conocimiento de poblaciones de *Rhizobium*, ya que esto permite seleccionar las bacterias mejor adaptadas para llevar a cabo la fijación de nitrógeno, de esta manera se puede disponer de información detallada acerca de una población específica, que eventualmente pueda ser utilizada en la elaboración de biofertilizantes.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los perfiles de isoenzimas de *Rhizobium spp* aislados de diferentes suelos del departamento de Nariño, empleando para ello la técnica de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE).

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Aislar *Rhizobium spp* de nódulos de arveja (*Pisum sativum*) de diferentes lugares del departamento de Nariño.
- ✓ Seleccionar aislados de *Rhizobium spp* de la colección del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, bajo parámetros de viabilidad y pureza.
- ✓ Determinar el grado de polimorfismo de los sistemas enzimáticos a estudiar.
- ✓ Determinar la variabilidad genética de los diferentes aislados.

2. MARCO TEORICO

2.1 VARIABILIDAD GENETICA DE POBLACIONES

Una población es un grupo de individuos que viven en una misma área y que comparten un mismo conjunto de genes. El conjunto de genes o genoma es la suma de toda la información genética que poseen los miembros de la población. La genética de poblaciones estudia la variabilidad genética de las poblaciones naturales. Al cambiar la composición genética de las poblaciones se produce el proceso evolutivo de la especie.

Dentro de una determinada especie no existe una absoluta homogeneidad genética, por el contrario, distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar ligeras diferencias genéticas. Para la genética de poblaciones, el proceso evolutivo consiste en cambios en la constitución genética de las distintas poblaciones de una especie. Estos cambios son debidos a distintos mecanismos que afectan a las frecuencias génicas de la población.

La teoría de la evolución por selección natural sostiene que la evolución es consecuencia de la interacción entre variación genética y selección. Según el Teorema Fundamental de la Selección Natural de Fisher, la tasa de evolución está limitada por la cantidad de variabilidad genética existente en la población. Experimentalmente, Ayala (1965)³ pudo demostrar que existe una relación directa entre variabilidad genética y tasa de evolución: cuan mayor es la variabilidad genética que existe en la población mayor es su tasa de evolución. Por ello, la caracterización de la variabilidad genética (su origen, cuantificación, mantenimiento e importancia evolutiva) es un objetivo importante en la genética de poblaciones.

Desde los inicios de la genética de poblaciones se ha constatado la existencia de una gran cantidad de variación genética en las poblaciones naturales. En un principio, esta variabilidad genética se observó, principalmente, estudiando caracteres morfológicos (variabilidad de forma, tamaño, etc.) y citológicos (polimorfismos por inversiones, translocaciones, etc.). Las primeras aproximaciones experimentales llegaron con los trabajos de selección de mutantes, que confirmaban esta presencia de variación genética en las poblaciones. Sin embargo, mediante este tipo de experimentos no era posible cuantificar de una manera precisa la cantidad de variabilidad genética existente. Se observaban los distintos fenotipos pero no se podía saber cuales eran las frecuencias génicas de cada uno de ellos.

Otra importante limitación de estos estudios fue el desconocimiento de la importancia relativa de los loci invariantes, ya que únicamente se detectaban los loci polimórficos, los que presentaban variación genética. Al no conocerse la relación de loci polimórficos respecto de monomórficos era imposible una cuantificación correcta de la variabilidad genética.

³ AYALA, F. y ORSKOW, I. Evolution of fitness in populations of *Drosophila Serrata*. *Science* 150, 903 – 905.

Paralelamente al trabajo realizado experimentalmente, los genetistas de poblaciones teóricos iban desarrollando con gran rapidez la teoría matemática de la genética de poblaciones. Sin embargo, existió poca interacción en el trabajo de ambos grupos. Mientras los teóricos trabajaban con el concepto de frecuencia génica, los estudios experimentales se centraban en los cambios detectados fenotípicamente.

En organismos eucariotas se formularon dos teorías sobre la estructura genética de poblaciones: La hipótesis clásica, propuesta por Herman Muller, postulaba que cada individuo sería homocigoto en casi todos los loci para el alelo normal, presentando en muy pocos el alelo mutante en heterocigosis; esto sería debido a que el alelo mutante, normalmente deletéreo, sería eliminado rápidamente de las poblaciones por selección negativa. En este caso, el principal papel de la selección natural consistiría en la eliminación de los alelos deletéreos. Una consecuencia de esta hipótesis es que existiría poca variabilidad genética intrapoblacional, la mayor parte de la variación genética de una especie sería interpoblacional.

La hipótesis equilibrada, propuesta por Theodosius Dobzhansky, proponía por el contrario que los individuos serían heterocigotos para casi todos los loci y que estos polimorfismos se mantendrían por selección positiva. Como consecuencia, la variación genética intrapoblacional sería muy grande.

El origen de estas dos hipótesis proviene en gran medida del enfoque experimental empleado por sus autores. Así, Muller trabajaba en el laboratorio con mutantes de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) con un efecto generalmente deletéreo, y en 1927 demostró que las radiaciones ionizantes eran capaces de producir alteraciones genéticas, y desarrolló técnicas cuantitativas para medir en este organismo la proporción de mutaciones inducidas. En cambio, Dobzhansky al estudiar directamente las poblaciones naturales de *Drosophila* había observado una enorme cantidad de variabilidad morfológica, publicando los fundamentos de su teoría en el libro “Genética y el origen de las especies” (1937).

2.1.1 Variabilidad Genética en Bacterias. La aplicación de los estudios de genética de poblaciones en las bacterias debe situarse en un tiempo relativamente reciente, a partir de la década de los años 80. Estos estudios fueron iniciados por genetistas de poblaciones interesados en las bacterias, como Milkman y Selander, en vez de genetistas bacterianos o microbiólogos interesados en genética de poblaciones. Este interés por el mundo bacteriano se debió a que las bacterias constituían un grupo atractivo de organismos al tener cortos tiempos de generación, tratarse de individuos haploides, y por tener la capacidad de adquirir elementos genéticos accesorios.

La principal diferencia con organismos eucariotas, que es donde han tenido mayor extensión, los estudios de variabilidad genética y en procariotas, reside en el modo de reproducción. En las bacterias, la reproducción y el intercambio de genes son realizados por mecanismos distintos e independientes, por ello, decimos que su reproducción es asexual. En cambio, en los organismos superiores estos mecanismos están unidos en un mismo proceso citológico, presentando una reproducción sexual. Por ello, las leyes que gobiernan la genética de

poblaciones en bacterias son, aparentemente, menos complejas que las de los organismos sexuales.

Al abordar los estudios de variabilidad genética en bacterias se deben considerar otras características de estas poblaciones que también difieren de las poblaciones eucariotas y que condicionan su proceso evolutivo. Existen tres mecanismos básicos de intercambio génico en los procariotas: la transformación, la conjugación y la transducción. La importancia de estos tres mecanismos de intercambio genético varía entre los distintos procariotas y no es un proceso obligado en cada generación. En principio, este intercambio génico no es frecuente en bacterias, ya que se ha observado que la recombinación es rara en la mayoría de las poblaciones naturales. El tamaño de los fragmentos génicos intercambiados es pequeño, comparado con los eucariotas, y varía según el mecanismo implicado. La recombinación en bacterias puede producirse entre cepas de una misma especie (intraespecie) o incluso, entre cepas de especies genéticamente relacionadas (interespecie).

Estas diferencias en el tipo de intercambio genético proporcionan patrones de evolución distintos para procariotas y eucariotas, por lo que algunos de los hechos que se consideran dogmas para el intercambio genético en eucariotas, no son aplicables para las bacterias. Uno de estos dogmas es que la selección natural tiene un efecto limitado sobre la diversidad genética de una especie animal o vegetal. En cambio, en el caso de las bacterias la selección natural tiene un papel muy importante porque elimina diversidad en las poblaciones, al seleccionar aquellas cepas mejor adaptadas.

2.1.2 Electroforesis de Isoenzimas Multilocus. Un gran cambio en el estudio de la variabilidad genética se produce en 1966 con la introducción de la técnica electroforética (Hubby y Lewontin)⁴. La electroforesis de proteínas es una técnica potente, rápida y sencilla, que permite obtener estimaciones de las frecuencias génicas y de la variabilidad genética existente en las poblaciones. La aplicación de esta técnica conllevó al desarrollo de la metodología de la *electroforesis de enzimas multilocus* (MLEE), que rápidamente se utilizó de forma estandarizada en los estudios de genética de poblaciones.

La electroforesis se basa en la movilidad de las proteínas por acción de un campo eléctrico, dependiendo primeramente de la carga neta de los aminoácidos de la superficie, y también de la conformación y el tamaño de la molécula. La carga neta de una proteína depende del pH del tampón en que se encuentra disuelta y de su punto isoeléctrico. Si el pH del tampón es bajo, los grupos carboxilo (COO^-) de la molécula se neutralizan y predominan los grupos amonio (NH_4^+), dándole a la proteína una carga neta positiva; y viceversa. La velocidad de migración está en dependencia de la carga de la molécula, lo mismo que de la intensidad de la corriente y de la fuerza iónica del tampón.

⁴HUBBY, J.L. Y LEWONTIN, R.C. A Molecular Approach to study of genic heterozygosity in natural populations. 1966.

La carga neta de una proteína está en relación directamente con la secuencia de aminoácidos y, por tanto, también con la secuencia de bases del correspondiente gen estructural. Las diferentes movilidades electroforéticas obtenidas para una misma enzima se interpretan como formas aloenzimáticas, es decir, como productos génicos de un alelo diferente del gen estructural que codifica para esta enzima.

Con la técnica MLEE se estudia el polimorfismo de los productos génicos, es decir, se detecta la variabilidad a nivel proteico. Esta técnica detecta las variaciones en la secuencia de aminoácidos que afectan a la movilidad electroforética de enzimas metabólicas. Se basa en someter a electroforesis, en condiciones no desnaturizantes, los extractos crudos citoplasmáticos de los individuos a estudio, y seguidamente, teñir los geles para detectar la actividad enzimática de una única proteína.

La técnica MLEE ha sido aplicada a un gran número de microorganismos de acuerdo a la siguiente tabla; en *Rhizobium spp* se han encontrado seis estudios en los cuales la diversidad genética promedio oscilo en un rango de 0.27 a 0.68⁵.

⁵ RAMIREZ, M. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum bv. trifolii*. II Perfiles de Isoenzimas. Revista de suelos Ecuatoriales. Vol. 25 (1195), p. 118 - 126

Tabla 1. Especies Bacterianas Estudiadas con la Técnica MLEE

ESPECIE BACTERIANA	REFERENCIA
<i>Bacillus subtilis</i>	Istock y col., 1992
<i>Bacteroides fragilis</i>	Gutacker y col., 2000
<i>Bordetelia spp.</i>	Musser y col., 1986
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Boerlin y col., 1992
<i>Brucella spp.</i>	Gándara y col., 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wise y col., 1995
<i>Campylobacter jejuni</i>	Nachamkin y col., 2001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Bertout y col., 1999
<i>Enterococcus faecalis</i>	Tomayko y col., 1995
<i>Escherichia coli</i>	Milkman y col., 1973; Caugant y col., 1981; Whittam y col., 1983; Ochman y col., 1983; Achtman y col., 1986; Whittam y col., 1988; Pupo y col., 1997; Souza y col., 1999
<i>Haemophilus influenzae</i>	Brenner y col., 1988; Musser y col., 1990; Fuste y col., 1996
<i>Helicobacter pylori</i>	Go y col., 1996
<i>Legionella pneumophila</i>	Selander y col., 1985
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bibb y col., 1990
<i>Mycobacterium spp.</i>	Wasen y col., 1991; Ohman y col., 1995
<i>Mycoplasma spp.</i>	O'Brien y col., 1981
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	O'Rourke y col., 1993
<i>Neisseria meningitidis</i>	Caugant y col., 1986; Campos y col./ 1992; Sáez-Nieto y col., 1992; Reeves y col./ 1995; Tzanakaki y col., 2001
<i>Pasteurella trehalosi</i>	Davies y col., 1997
<i>Proteus spp.</i>	Kappos y col., 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Martin y col., 1999; Lomholt y col., 2001
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sikorski y col., 1999; Rius y col., 2001
<i>Rhizobium spp.</i>	Eardly y col., 1990; Leung y col., 1994; Ramirez M., 1995; Harrison y col., 1989a; Mohd – Saud., 1990; Young J., 1985
<i>Salmonella spp.</i>	Selander y col., 1990
<i>Serratia marcescens</i>	Gargallo y col., 1987
<i>Shigella spp.</i>	Ochman y col., 1983
<i>Staphylococcus aureus</i>	Musser y col., 1990
<i>Streptococcus mitis</i>	Hohwy y col., 2001
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Muñoz y col., 1992; Sibold y col., 1992
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Musser y col., 1991
<i>Vibrio cholerae</i>	Desmarchelier y col., 1988; Salles y Momen, 1991; Wachsmuth y col., 1993; Evins y col., 1995; Beltran y col., 1999; Farfán y col., 2000.
<i>Yersinia spp.</i>	Schill y col., 1984; Goulet y Picard, 1984; Dolina y col., 1993

Fuente FARFAN, Maribel. Estudio de la estructura genética de poblaciones de *Vibrio Cholerae*. Universidad de Barcelona. España, 2002.

2.1.2.1 Isoenzimas. El término fue acuñado por C.L. Markert y F. Moller en 1959 para describir múltiples enzimas con especificidad de sustrato igual (enzimas distintas que trabajan sobre un mismo sustrato) o muy similar, y que ocurren en el mismo organismo. Markert luego propuso modificar el término para que incluyera adjetivos como alélico, no - alélico, multimérico, conformacional y conjugado. Estos adjetivos implican una definición más amplia del término isoenzima y por lo tanto ahora incluye variaciones genéticas y modificaciones fisiológicas de las estructuras proteicas.

Es importante aclarar que el término Aloenzima o Aleloenzima, es empleado para referirse a las distintas formas moleculares de una misma enzima producidas por distintos alelos del mismo locus. Sin embargo, el vocablo isoenzima es más amplio, ya que se incluye tanto a las diferentes formas moleculares de una misma enzima producidas por alelos del mismo locus, como a las producidas por alelos de distintos loci.

Esta multiplicidad enzimática puede ser debida a diversas causas: genéticas, como resultado de variaciones en la secuencia de nucleótidos del gen o genes responsables de su síntesis, como post-transcripcionales, como consecuencia de las modificaciones una vez sintetizada la enzima. Pero estas modificaciones post-transcripcionales se pueden considerar como una fuente baja de error de este método, ya que la frecuencia con que se presenta este fenómeno es muy baja y, por tanto, no se cree que pueda generar ninguna modificación importante en los resultados finales. Se ha comprobado que la electroforesis de isoenzimas puede detectar sobre un 90% de las sustituciones de aminoácidos⁶.

En los estudios de genética de poblaciones, la técnica de MLEE se aplica a enzimas metabólicas, porque los genes que codifican estas enzimas están sometidos a una fuerte selección estabilizadora y, por consiguiente, la variación detectada es selectivamente neutra. En cambio, no es adecuado aplicarlo a productos génicos codificados por genes sometidos a selección diversificadora, porque la velocidad de cambio de estos loci, ya sea originada por mutación, recombinación o ambas, no reflejaría la divergencia del genoma entero.

La electroforesis de isoenzimas es una herramienta muy útil para el estudio de la diversidad genética y estructural de poblaciones naturales. Se empezó a utilizar a partir de la década de los 60, sobretudo en poblaciones de eucariotas, sin embargo su aplicación en procariotas no llega sino hasta principios de los 80. En los años 60, esta técnica daba aportaciones nuevas a la taxonomía de los eucariotas, y a la variación genética entre poblaciones y entre individuos, siendo así una importante fuente de información para las hipótesis evolutivas. A nivel de procariotas se limitaba su uso a la identificación de cepas bacterianas a nivel de especie⁷. Con el tiempo, la técnica de MLEE se consolidó como un método estándar en la genética de poblaciones de eucariotas, tomando, en muchas ocasiones, a *Drosophila spp* como modelo de valor universal. La aplicación de la técnica de MLEE se retrasó en las bacterias, no por falta

⁶ McLELLAN, T. Molecular charge and electrophoretic mobility in cetacean myoglobins of known sequence. *Biochem. Genet.* 22, 181 – 200. (1984).

⁷ LUND, M.C.J., y col. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of microorganisms. 1998.

de una metodología adecuada, sino por la inexperiencia de los genetistas poblacionales para trabajar con técnicas propias de la microbiología (medios y condiciones de cultivo, procesos de esterilización, protocolos de identificación bacteriana, etc.). En 1967, Bowman & col.⁸, a través de su trabajo con distintas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, demostró claramente el poder de la técnica para revelar variaciones genéticas dentro de una especie y entre especies. Pero, aún seguía considerándose esta técnica sólo como un método de tipado para caracterizar cepas, ya que había muchos problemas planteados a los que no se les daba solución.

Formalmente, la genética de poblaciones bacterianas se inicia con el trabajo de Milkman (1973)⁹, al analizar la variación alélica para cinco enzimas metabólicas de una población de 800 cepas de *Escherichia coli*. Este trabajo pionero fue prolongado por Selander y Levin en una serie de estudios con *Escherichia coli* y *Shigella spp*, que implicaban varios miles de aislados¹⁰; desde entonces se han publicado numerosos estudios de aplicación de la técnica de MLEE para determinar la estructura poblacional de especies bacterianas.

2.2 BACTERIAS DEL GENERO RHIZOBIUM

El *Rhizobium* es una bacteria Gram negativa, aerobia obligada y en forma de "bastón con 0.5 a 0.9nm de diámetro y 1.2 a 3.0nm de longitud. Se tornan pleomórficos con ciertas condiciones de crecimiento"¹¹, se caracterizan por la habilidad para infectar las leguminosas e inducir en ella la formación de nódulos. Las colonias son de crecimiento rápido y producen ácido. Algunas cepas de *Rhizobium spp*, contienen a menudo gránulos metacromáticos (en células jóvenes), son mótils, con flagelos polares o peritricos y se tiñen fácilmente con las tinturas básicas simples, aunque las más viejas necesitan más tiempo para absorber el tinte y tienen zonas no teñidas (de polihidroxibutirato), que les da un aspecto lisado; esta bacteria que pertenece a la familia *Rhizobiaceae* es un microorganismo del suelo que forma asociación simbiótica con distintas especies de plantas y durante la simbiosis es capaz de llevar a cabo la *fijación de nitrógeno*.

2.2.1 Características generales de las colonias. Somasegaran y Hoben¹² afirman que las colonias típicas crecen sobre un medio estándar de levadura - manitol - agar (LMA) y que estas tienen las siguientes características:

Forma: las colonias tienen una forma de lenteja típica discreta y sobre la superficie del agar las colonias circulares varían de forma plana a convexa y cónica.

Color y textura: las colonias pueden ser blancas - opacas o pueden verse de lechosas a acuosas traslúcidas. El crecimiento de las colonias opacas es generalmente firme con poca

⁸ BOWMAN, J.E., and CARSON, P.E. Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis. 1967.

⁹ MILKMAN, R. & BRIDGES, M.M. Electrophoretic variation in *Escherichia Coli* from natural sources. 1973.

¹⁰ LEVIN, B.R. Infectious gene exchange and the genetic structure of *Escherichia Coli* populations. 1981

¹¹ SILVESTER - BRADLEY, y otros. Simbiosis Leguminosa - Rhizobium, Evaluación, Selección y Manejo.

¹² SOMASEGARAN, P. HOBEN, H. Methods in Legume - Rhizobium Technology. University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN.

goma mientras que las colonias menos densas son usualmente gomosas y suaves. Estas pueden ser brillantes o sin brillo, opacas aplanadas o traslúcidas.

Tasa de crecimiento: es generalmente de tres a cinco días para las bacterias de crecimiento rápido y de cinco a siete días para las de crecimiento lento y de siete a doce días para alcanzar el tamaño máximo en agar o crecimiento en medio líquido. La tasa de crecimiento varía según la temperatura de incubación (óptima: 26 a 30°C), origen (cultivo o nódulo), aireación (en cultivos líquidos) y la composición del medio.

Tamaño cuando las colonias están bien separadas en las cajas con agar el tamaño de la colonia puede variar desde 1 mm, para muchas cepas de crecimiento lento, a 4 - 5mm para las cepas de crecimiento rápido. En cajas con un gran número de colonias estas permanecen más pequeñas y discretas pero con crecimiento confluyente.

2.2.2 Estudios de Biodiversidad. Los estudios de biodiversidad en *Rhizobium* han sido clásicamente realizados en función del rango de hospedador, de las propiedades antigénicas, de la resistencia a antibióticos, por su contenido total en proteínas¹³. Sin embargo, el uso de características fenotípicas para el estudio de *Rhizobium* tiene bastantes limitaciones como han apuntado algunos autores¹⁴. Ello ha impulsado la aplicación de metodologías alternativas, como son las basadas en el polimorfismo isoenzimático, para la determinación de relaciones genéticas entre cepas (MLEE, "multilocus enzyme electrophoresis"), o técnicas moleculares para detectar diferencias genómicas intrínsecas de la población estudiada.

Gracias al avance tecnológico, nuevos géneros y especies han sido propuestos, demostrándose esta vez, a nivel genético, las características taxonómicas de estas bacterias. En 1996, Young y Haukka publicaron la relación de especies de rizobios clasificados hasta esa fecha (Anexo A), la cual constituye una de las más recientes revisiones de esta familia, aunque posteriormente se han propuesto otros géneros y especies (Anexo B).

2.2.3 Metodologías Usadas Para la Caracterización de Rizobios. Los estudios actuales que permiten identificar las diferentes especies y géneros de rizobios están basados en criterios muy específicos con el fin de evitar posibles errores de clasificación. Es por eso que existen criterios que señalan la taxonomía de los rizobios en una etapa de transición, ya que algunos de los métodos utilizados para clasificar esta bacteria en décadas pasadas han dejado de ser únicos en su tipo y han cedido paso a técnicas de biología molecular. Aunque se mantienen muchos de los análisis fenotípicos y el estudio de la simbiosis leguminosa - rizobio, ya que en éstas se evalúan las funciones fisiológicas y ecológicas de la célula.

Por otra parte, Martínez-Romero y Caballero-Mellado (1996) señalaron que incluso unos pequeños cambios genéticos pueden causar efectos profundos en el fenotipo. Por esta razón,

¹³ HARRISON, SP. JONES, DG. & YOUNG, JPW. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. 1989.

¹⁴ DEMEZAS, DH. REARDON, TB. WATSON, JM. & GIBSON, AH. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses..

los sistemas basados solamente en el fenotipo pueden conllevar a resultados confusos, divergentes y distorsionados.

Evaluaciones del fenotipo Las evaluaciones fenotípicas se basan principalmente en el crecimiento de las colonias en LMA, presencia o ausencia de deshidrogenasa 6-fosfogluconato-NADP, utilización de carbohidratos como fuente de carbono para el crecimiento, resistencia a antibióticos, respuesta a la presencia de metales pesados y diferentes niveles de NaCl y pH, características fisiológicas que aunque difieren entre géneros y especies, incluso entre cepas, son transmitidas por intercambio genético (interacción cooperativa) entre miembros de poblaciones bacterianas.

Los lipopolisacáridos (LPS) son parte de la pared bacteriana en Gram negativos. Estos, junto con los exopolisacáridos juegan un papel importante en la determinación de la especificidad del hospedero. Una parte de los LPS (antígeno-O) se supone que protege la bacteria contra las toxinas vegetales involucradas en el desarrollo del nódulo. La caracterización de los lipopolisacáridos fue usada como uno de los métodos para proponer de *R. galegae* como nueva especie en el género *Rhizobium*.

También se utiliza el método del análisis de la composición de ácidos grasos (FAME). Los ácidos grasos constituyen la mayor parte de los lípidos y liposacáridos y han sido analizados con propósitos taxonómicos. Este método, según Sasser y Wichman (1991) y Stead (1992) es uno de los más usados para los análisis taxonómicos rápidos.

Toda sustancia que provoque una respuesta inmunológica al ser introducida en animales o humanos se le considera como antígeno. Cuando se trabaja con rizobios, se usan conejos para la inmunización y los antígenos son suspensiones de rizobios. Los métodos serológicos se utilizan con frecuencia ya que resultan de suma importancia, por la especificidad en la identificación y caracterización de los rizobios.

Los resultados de estas técnicas son procesados a través del análisis numérico, enfoque actual de la taxonomía numérica, la cual se desarrolló paralelamente con la computación. Esta permite la comparación simultánea de grandes cantidades de rasgos fenotípicos para grandes cantidades de cepas. El análisis numérico también es utilizado para la caracterización genotípica y se realiza tanto en una como en la otra, mediante programas computarizados o paquetes de software.

3. METODOLOGIA

3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA BACTERIA

Se estudiaron en total 33 aislados de *Rhizobium spp*; de los cuales, 24 se seleccionaron de la colección del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno de la Universidad de Nariño, y 9 fueron aislados y purificados a partir del nódulo de plantas de arveja (*Pisum sativum*).

La recolección de los nódulos de las raíces de plantas de arveja, se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Somasegaran y Hoben¹⁵. Los lugares seleccionados fueron los municipios de Carlosama con una temperatura promedio de 12°C y 2980 m (a.s.n.m); Iles con temperatura promedio de 12°C y 3000 m (a.s.n.m) y Puerres con temperatura promedio de 13°C y 2817 m (a.s.n.m) (Ver figura 1). Se escogieron estos lugares con el propósito de ampliar el espectro poblacional de la colección de *Rhizobium* del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, por ser localidades productoras de leguminosas.

Tabla 2. Número de muestras y su procedencia.

No. Muestras	Localidad	No. Muestras	Localidad
3	Peñol	3	Iles*
3	Pasto	3	Funes
3	Guitarrilla	3	Puerres*
3	Tangua	3	Córdoba
3	Imués	3	Carlosama*
3	Yacuanquer		

* Muestras aisladas en esta investigación.

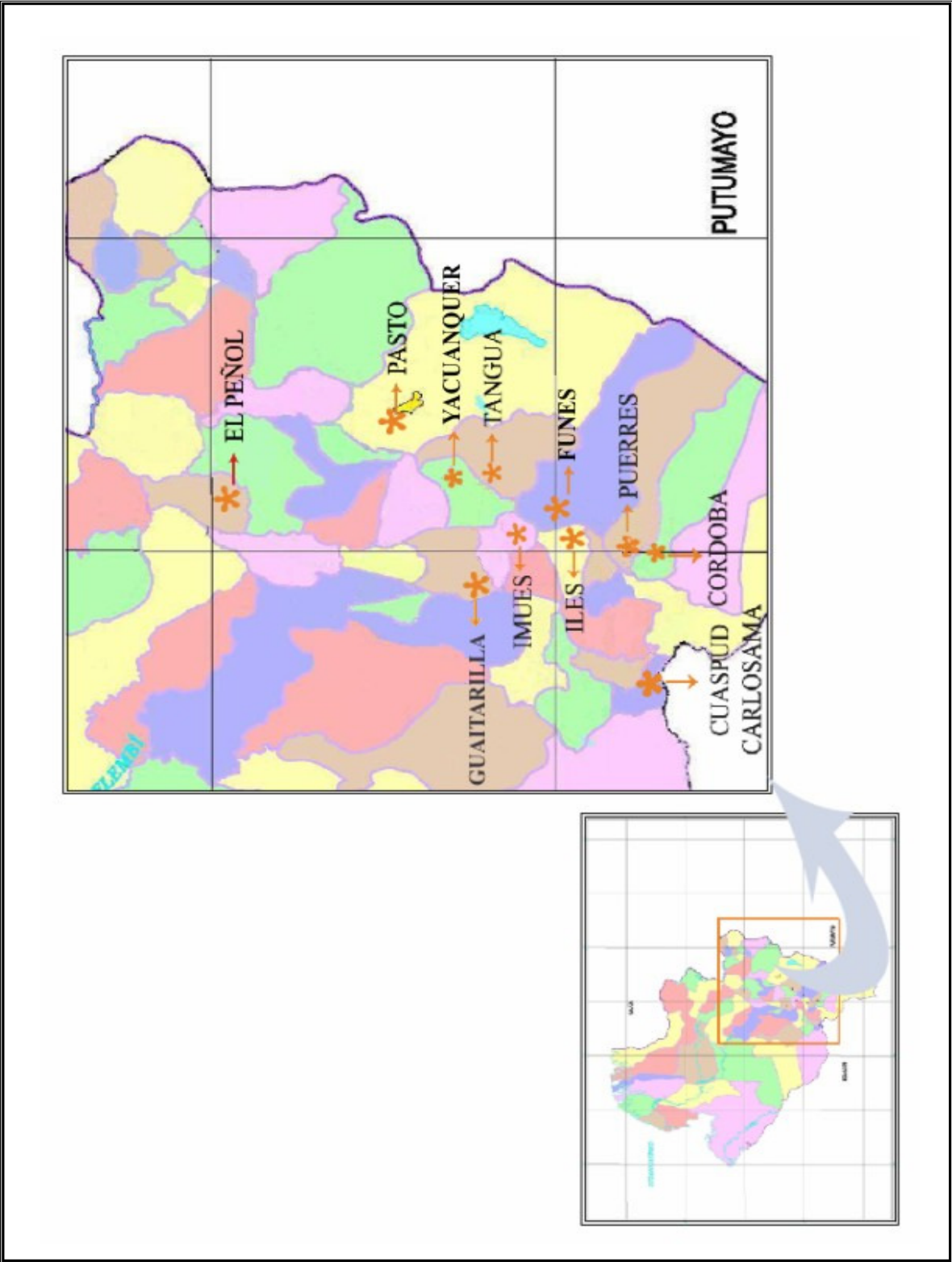
3.1.1 Determinación del pH del suelo. Para las muestras aisladas, fue necesario medir el pH del suelo del cual fueron tomados los nódulos; para ello se procedió de acuerdo a lo reportado por CALDERON, F. y PAVLOVA, M.¹⁶

3.1.2 Aislamiento de *Rhizobium* desde el nódulo. Se lavaron las raíces hasta remover completamente el suelo; se seleccionaron seis nódulos por cada planta, los nódulos se separaron de la raíz dejando unos 5mm de esta unida al nódulo, esto con el propósito de facilitar el manejo y reducir el riesgo de dañar el nódulo.

¹⁵ SOMASEGARAN, Op. Cit., p. 21

¹⁶ CALDERON, F. y PAVLOVA, M. Metodologías para Análisis Químico de Suelos. Determinación del pH del suelo. 1999. http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis_De_Suelos/MetodosQuimicosSuelos.htm#4

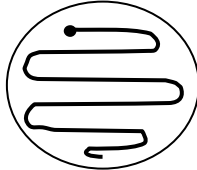
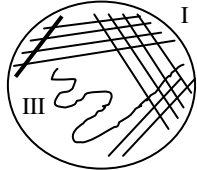
Figura 1. Localidades de muestreo ubicadas en el mapa del departamento de Nariño



Se sumergieron los nódulos intactos en etanol (para romper la tensión superficial y remover las burbujas de aire del tejido); se transfirieron a una solución de peróxido de hidrogeno al 5% por cinco minutos. Se lavaron con cuatro porciones de agua estéril, usando pinzas estériles para manipular los nódulos.

Posteriormente los nódulos desinfectados superficialmente, se comprimieron con ayuda de un par de pinzas de extremo despuntado, sobre una gota de agua estéril en una caja petri; con la suspensión se trazó, con un asa estéril, sobre la superficie de un medio de levadura-manitol-agar (LMA) + rojo congo; una de las siguientes formas.

Métodos de Trazado

Método 1	Método 2
	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Inocular. 2. Esterilizar el asa y trazar la estría. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inocular. 2. Esterilizar el asa y trazar I 3. Esterilizar el asa y trazar II y III

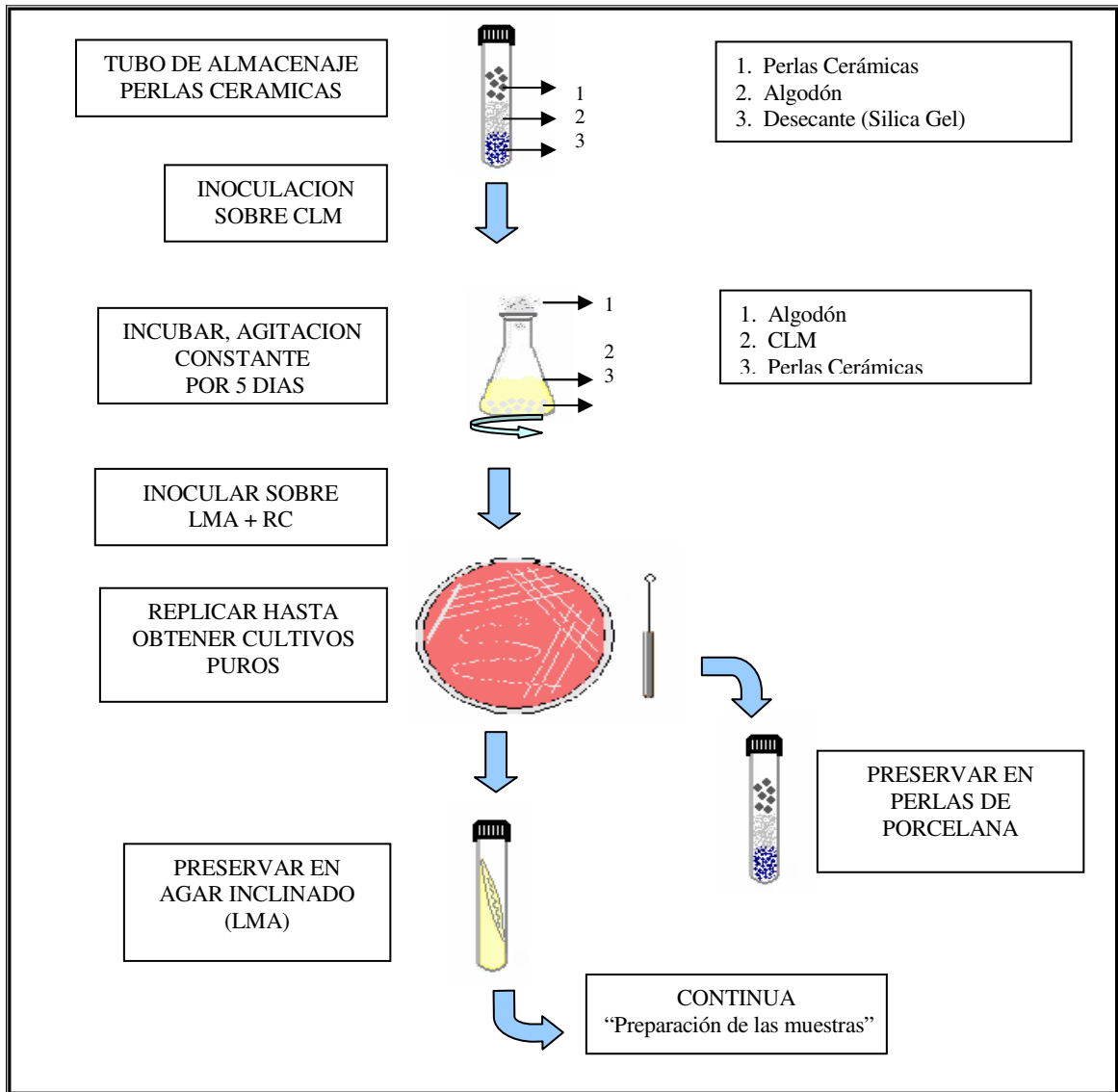
Fuente: SOMASEGARAN, Op. Cit., p. 21

Se seleccionaron colonias típicas de *Rhizobium*, 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.

3.1.3 Regeneración de cultivos a partir de perlas de porcelana. Para la selección de aislados del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno se tomó en cuenta de que dicho aislado permaneciera en buenas condiciones de viabilidad y pureza. Para regenerar los cultivos se procedió de acuerdo a lo reportado por SOMASEGARAN y HOBEN¹⁷, y que se resume a continuación en el siguiente diagrama de flujo.

¹⁷ SOMASEGARAN, Op. Cit., p. 21

Figura 2. Regeneración de Cultivos Desechados.



3.2 DETERMINACIÓN DE PERFILES ISOENZIMÁTICOS

3.2.1 Obtención de Extractos Proteicos. Para preparar los extractos que se sometieron a electroforesis, se procede así: se cultivaron los aislados en medio líquido triptona – levadura (TY) enriquecido (ver Anexo C) con las condiciones apropiadas para su crecimiento, incubando a temperatura ambiente y en agitación orbital durante 4 días hasta obtener una densidad celular aproximada de 10^7 bacterias/ml que se determinó realizando una lectura espectrofotométrica de cada uno de los inóculos y comparando este valor de absorbancia con una curva de calibración construida de acuerdo a lo reportado por SOMASEGARAN y

HOBEN¹⁸. De esta manera se aseguró la obtención de una concentración suficiente de enzimas en los lisados.

Seguidamente el contenido del matraz se centrifugó para recuperar las células del medio, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó repetidas veces con solución Ringer estéril. A continuación se descartaron los sobrenadantes, el sedimento se resuspendió en tubos eppendorf con tapa rosca sobre el tampón de lisis Tris EDTA - NADP (TE - NADP) y se congeló a una temperatura de -20°C.

✓ Para lisar las células se ensayaron tres métodos:

- Congelación – descongelación en el cual se sometieron las muestras a un choque de temperatura en varios ciclos; sin embargo la concentración proteica de los extractos después de centrifugar, era muy baja y estos cambios de temperatura inhibían la actividad enzimática.

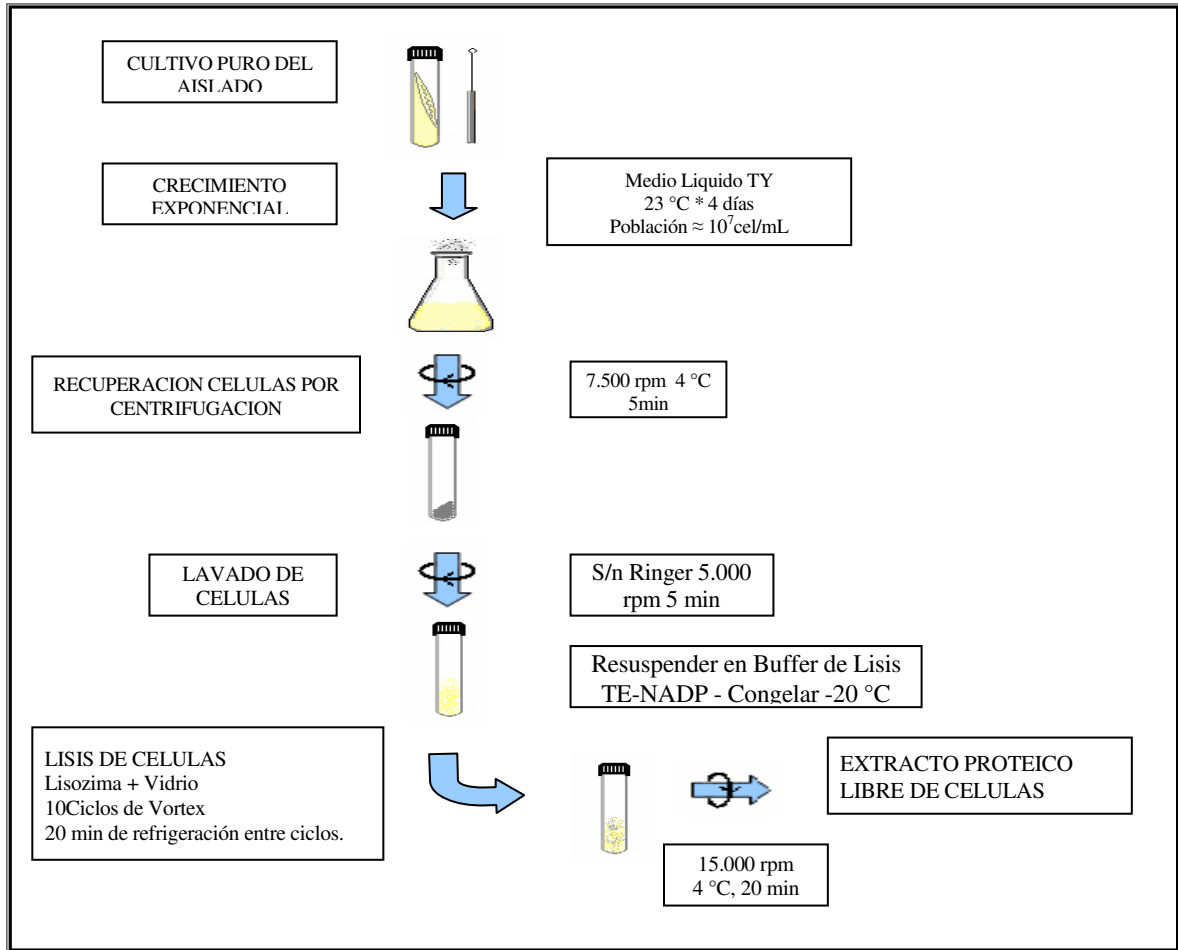
- Método abrasivo. Originalmente en este método se emplean perlas de vidrio con diámetros aproximados de 0.5 - 1mm que se encuentran comercialmente; el método se modificó empleando vidrio macerado; seguidamente éste se lavó con HCl concentrado por 1 hora y se enjuagó con agua destilada repetidas veces hasta pH neutro. Se ensayaron diferentes proporciones de vidrio – sedimento celular (pellet) 0.5:1, 1:1, 2:1 y 3:1; cada una de las muestras se sometió a 10 ciclos de 10 minutos de vortex y 30 minutos de congelación a -20°C. Se obtuvieron mejores resultados con la proporción 2:1, pero las concentraciones de proteína en los extractos no alcanzaban los niveles mínimos requeridos para someter a electroforesis (2µg/µL).

- Finalmente se optó por combinar un método enzimático con el método abrasivo descrito anteriormente. Se adicionaron 100µL de lisozima al 1% (MP Biomedicals 100831) a cada muestra. Así se logró degradar la pared celular de las bacterias, liberándose el material citoplasmático de cada uno de los aislados, en el buffer. Después se centrifugó para eliminar los restos celulares del sobrenadante (Ver figura 3). La concentración proteica obtenida fue satisfactoria y el sobrenadante se repartió en tubos eppendorf estériles y se guardó a una temperatura de -20 °C hasta su uso. Se determinó la concentración proteica de los extractos crudos obtenidos aplicando el método Lowry - modificado descrito en 1951¹⁹, empleando albúmina sérica bovina como patrón. Todas las diluciones, tanto de las muestras como de la curva patrón se realizaron con agua bidestilada para evitar posibles interferencias debidas a componentes del tampón utilizado.

¹⁸ SOMASEGARAN, Op. Cit., p. 21

¹⁹ Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., “Protein measurement with the Folin Phenol Reagent”.

Figura 3. Obtención de los extractos proteicos.



Preparación de los geles de poliacrilamida. Los geles utilizados en este estudio fueron geles de poliacrilamida verticales en condiciones no desnaturizantes continuos o discontinuos en función de la enzima a determinar. El tamaño de los geles fue de 10 x 8 cm y el grosor de 1 mm, permitiendo cada uno de ellos el estudio de 17 muestras.

Tabla 3. Composición de geles continuos.

SOLUCIÓN COMPONENTE	DUREZA		
	8%	9%	10%
Acrilamida / bisacrilamida al 30% en agua	4.266mL	4.800mL	5.334mL
Tampón Tris HCl 0.8M pH 8.8	7.100mL	8.000mL	8.000mL
Agua bidestilada	4.597mL	3.163mL	2.625mL
Solución de APS al 10%	30.0uL	30.0uL	30.0uL
TEMED	6.9uL	6.9uL	6.9uL
Volumen Final	16mL	16mL	16mL

En el caso de geles discontinuos, éstos constaron de 2 partes bien diferenciadas por su distinto tamaño de poro: el gel separador (o "resolving") que es más denso, y en el cual se efectúa la separación de las proteínas en función de su peso molecular, y el gel concentrador (o "stacking"), con una matriz más laxa, que tiene como misión, una correcta entrada y ordenación de las proteínas en el gel separador. La diferente concentración de acrilamida en cada uno de los geles se expresa en tanto por ciento; indicando primero la del gel separador y después la del gel iniciador (p.ej. 10% / 8%; 10% para el gel separador y 8% para el gel iniciador).

La selección del tipo de gel (continuo o discontinuo) para las enzimas peroxidasa y amilasa se determinó haciendo ensayos para obtener la mejor resolución de las bandas; para las enzimas restantes se utilizó el tipo de gel reportado por FARFAN, Maribel.²⁰

Tabla 4. Composición de geles discontinuos.

SOLUCIÓN COMPONENTE *	DUREZA		
	5%	8%	9%
Gel Separador			
Acrilamida / bisacrilamida al 30% en agua	1.66mL	2.66mL	3.00mL
Tampón Tris HCl 0.8M pH 8.8	5.00mL	4.42mL	5.00mL
Agua bidestilada	3.30mL	2.86mL	1.95mL
Solución de APS al 10%	48.6uL	48.6uL	48.6uL
TEMED	11.4uL	11.4uL	11.4uL
Volumen Final	10mL	10mL	10mL
Gel Concentrador			
Acrilamida / bisacrilamida al 30% en agua	1.00mL	1.60mL	1.8mL
Tampón Tris HCl 0.125M pH 6.8	3.00mL	2.66mL	3.0mL
Riboflavina	972uL	900uL	672uL
Agua bidestilada	0.93mL	804uL	492uL
Solución de APS al 10%	29.2uL	29.2uL	29.2uL
TEMED	6.84uL	6.84uL	6.84uL
Volumen Final	6mL	6mL	6mL

*(Las cantidades que se indican son para la preparación de dos geles)

Para preparar el gel de poliacrilamida se ensambló el molde (ver figura 4a); una vez armadas las piezas, los componentes del gel se mezclaron en un vaso de precipitados en las cantidades necesarias (Ver Tablas 3 y 4) se adicionaron los catalizadores (APS) al 10% (100mg de persulfato amónico(Sigma A-7460) en 1mL de agua bidestilada;) que es el iniciador de la polimerización del gel, y el TEMED (N,N,N',N',-Tetrametiletilendiamina; JT Baker NJ08885) que es el catalizador de esta reacción; inmediatamente se trasfiere esta solución al espacio entre los vidrios.

²⁰ FARFAN, M., Op. Cit., p. 18

Una vez finalizada la polimerización (aproximadamente transcurridos 20min) el gel se llevó en sus soportes de vidrio a la cámara de electroforesis, se adicionó el buffer de cámara Tris-Glicina 0.19M (Ver anexo D) el cual permite el contacto directo de los electrodos con el gel, luego se realizó un precorrido a 35mA por 30 min para que el persulfato de amonio migrara por delante del gel y evitar que pueda inhibir de la actividad enzimática.

La dureza del gel varió de acuerdo al sistema enzimático a determinar. En los geles continuos se emplearon concentraciones del 10%, 9% ó del 8%, y en los geles discontinuos fue del 8% ó 9% para el gel separador y del 8% ó 5% para el gel concentrador.

Tabla 5. Tipo y dureza del gel empleado según el sistema enzimático estudiado.

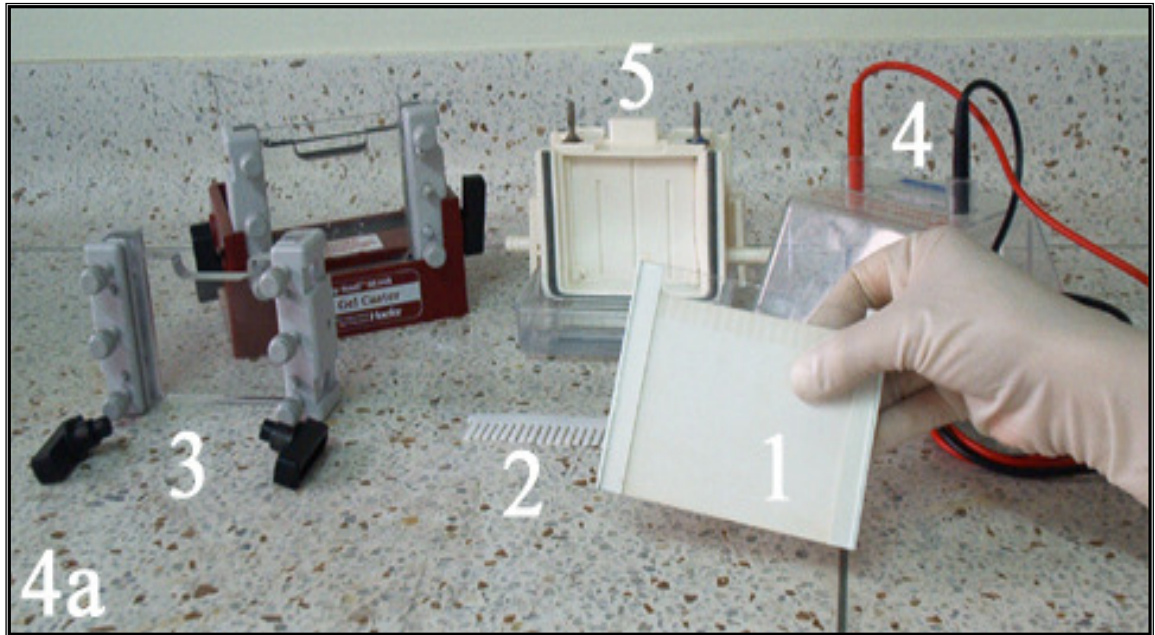
TIPO	DUREZA	ENZIMAS
Gel Continuo	10%	Malato deshidrogenasa (MDH) Aspartato deshidrogenasa (ASD) Lactato Deshidrogenasa (LDH)
	9%	Peroxidasa (PER1)
	8%	Alanina deshidrogenasa (ALD)
Gel Discontinuo Separador - Concentrador	9% - 8%	Amilasa (AMI)
	8% - 5%	Catecol-2,3-Oxigenasa (C23O)

3.2.2 Desarrollo de la electroforesis. El proceso de electroforesis vertical se desarrolló en un equipo *Mighty Small II SE250/SE260*, una fuente de poder *HOEFER PS 250 / 2.5Amp* y sobre geles de poliacrilamida, utilizando como buffer de cámara Tris – Glicina 0.19M pH 8.3 – 8.6 para todos los sistemas enzimáticos estudiados.

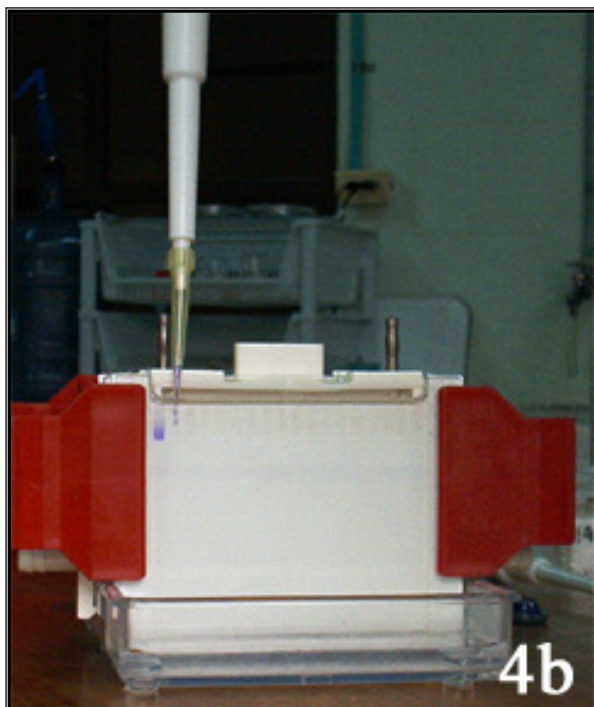
Se trabajó con un peine molde de 1mm de grosor, que permitía procesar 17 muestras simultáneamente y cargar un volumen máximo de 17 μ L (ver figura 4b). Antes de cargar la muestra se adicionó un 20% de una solución de glicerol - azul de bromofenol el cual permite observar el frente de corrida en el desarrollo de la electroforesis (ver figura 4b) (ver Anexo D para la preparación de esta solución).

Los electrodos se conectaron a una fuente de corriente eléctrica, adecuando el amperaje o el voltaje, y el tiempo necesario para la corrida electroforética. Se optimizaron dos tipos de condiciones electroforéticas a intensidad variable (MDH, ASD, LDH, ALD y C23O) y voltaje constante (PER1 y AMI), que permitieron el análisis MLEE de todos los sistemas enzimáticos del estudio. Todo el proceso de electroforesis se realizó bajo refrigeración (4°C) para prevenir la desnaturalización de las enzimas por el aumento de temperatura.

Figura 4. a. Preparación de un gel de poliacrilamida (1) Vidrios separados por reglas de teflón, que determinan el grosor del gel; (2) peine para formar los pozos para muestras; (3) bloque de plástico para ensamblar los vidrios; (4) Tapa de la cámara; (5) núcleo de la cámara de electroforesis, con los electrodos.



4b. Inyección de las muestras en los pozos después de la pre-corrída.



Placa con 2 μ L de azul de Bromofenol + Glicerol



Figura 5. Desarrollo de la Electroforesis

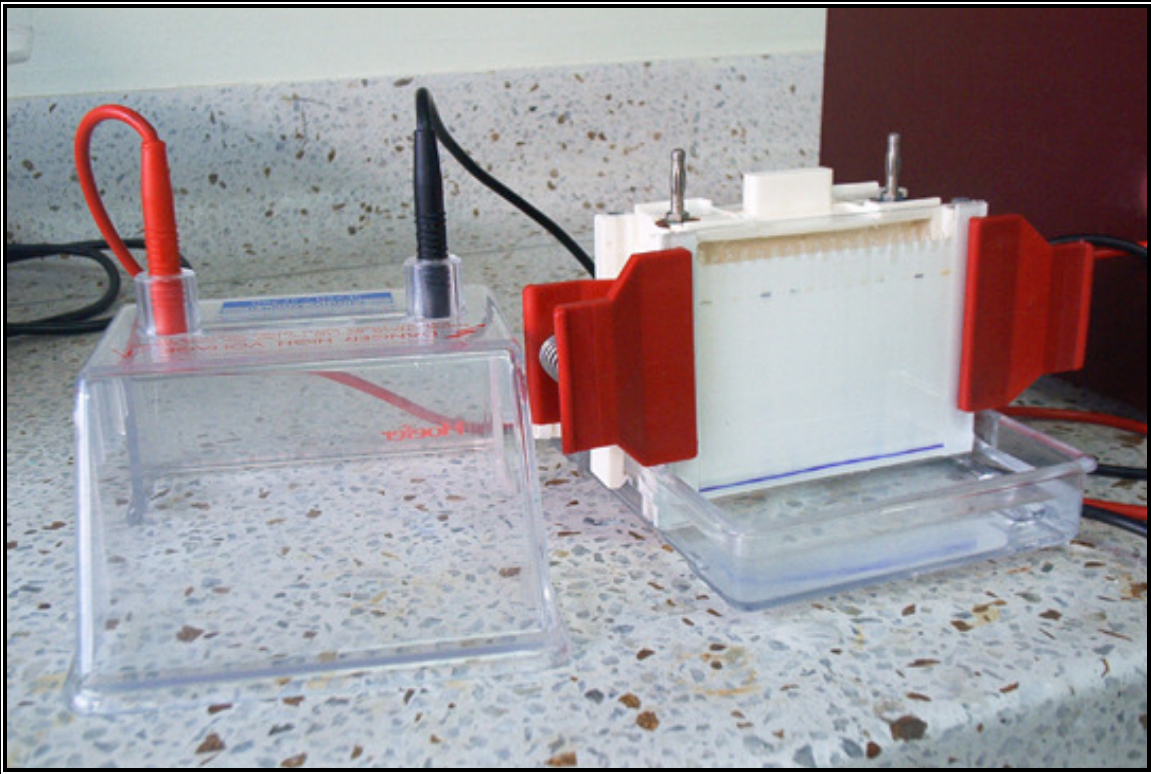


Tabla 6. Condiciones optimizadas de electroforesis de corta duración.

PROCESO	ELECTROFORESIS DE CORTA DURACIÓN	
	Intensidad Variable	Voltaje Constante
Pre-corrída	35mA por 30 min	100V por 30 min
Desarrollo de la Electroforesis	20mA por 30 min	150V final
	40mA final	
Duración	2 – 3 Horas	2 – 3 Horas

Durante la electroforesis de corta duración a intensidad variable, se aplica inicialmente una intensidad fija de 20mA durante 30 min para compactar las muestras y después se aumenta a 40mA hasta el final del proceso que puede durar entre 2-3 horas. En cambio en la electroforesis a voltaje constante se aplica un voltaje constante (150V) durante todo el proceso.

El proceso de electroforesis se da por terminado cuando el frente de corrida llega al final del gel (ver figura 5). Todos los aislados se sometieron a electroforesis por duplicado para confirmar la actividad enzimática.

3.2.3 Sistemas enzimáticos estudiados. Se analizaron 7 sistemas enzimáticos referenciados como polimórficos²¹ implicados en vías metabólicas centrales o en vías catabólicas de metabolitos importantes para la bacteria.

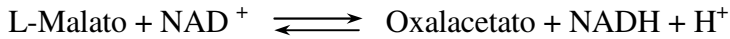
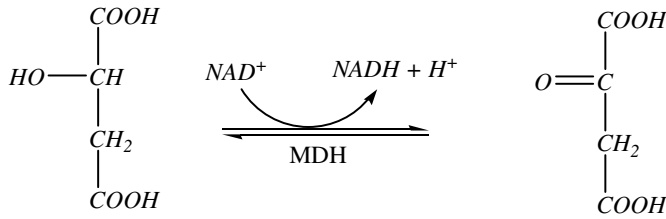
Tabla 7. Clasificación de las enzimas

CLASE DE ENZIMA	EC No.*	NOMBRE	ABREVIATURA
Grupo Oxidoreductasas	1.1.1.37	Malato Deshidrogenasa	MDH
	1.4.1.1	Alanina Deshidrogenasa	ALD
	1.4.3.16	Aspartato Deshidrogenasa	ASD
	1.99.2.a	Catecol 2,3 – oxigenasa	C23O
	1.1.1.27	Lactato Deshidrogenasa	LDH
	1.11.1.7	Peroxidasa	PER1
Grupo Fosfohidrolasas	3.2.1.1	Amilasa	AMI

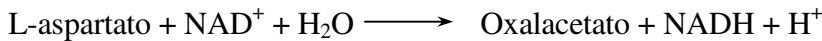
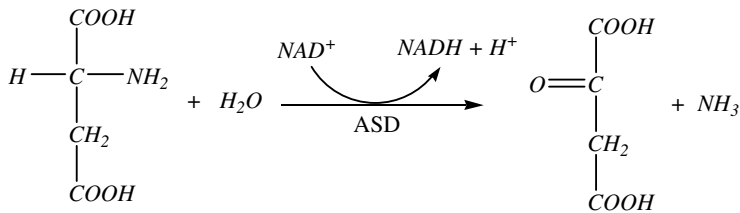
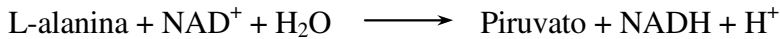
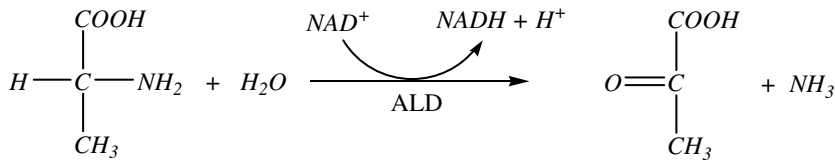
El Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) describe cada tipo de enzima caracterizada y le suministra un número de la EC (Comisión de la Enzima) <http://us.expasy.org>

²¹ FARFAN, M., Op. Cit., p. 18

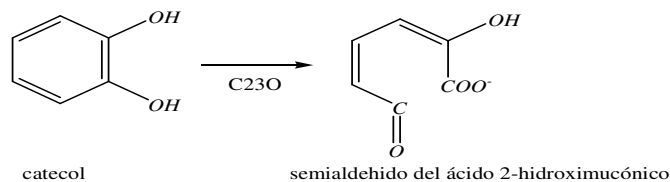
✓ La enzima Malato deshidrogenasa cataliza reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs.



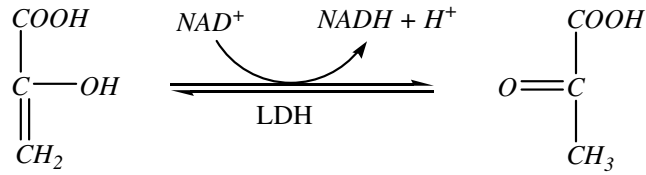
✓ Las enzimas Alanina deshidrogenasa y Aspartato deshidrogenasa participan en la desaminación de aminoácidos, utilizando como coenzima el NAD.



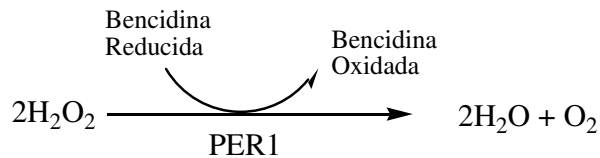
✓ La enzima Catecol-2,3-Oxigenasa está implicada en el metabolismo de compuestos aromáticos (como el triptófano, ácido benzoico, naftaleno, antraceno, fenoles, etc). La vía central de oxidación de estos sustratos aromáticos tiene como principal intermediario el catecol. Esta enzima cataliza la oxidación del catecol al semialdehído del ácido 2-hidroximucónico, producto que en soluciones alcalinas produce un intenso color amarillo.



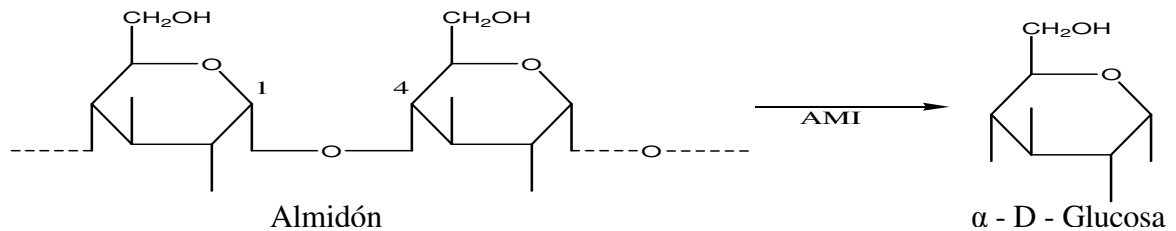
✓ La enzima Lactato deshidrogenasa es un tetrámero que participa en el ciclo piruvato-isovalerato-isoleucina catalizando la siguiente reacción empleando como cofactor NAD.



✓ La enzima Peroxidasa es una hemoproteína específica para H₂O₂ que usa un amplio rango de sustratos como donadores.



✓ La enzima Amilasa participa en la hidrólisis de enlaces α (1-4) de polisacáridos que contengan 3 o mas enlaces α (1-4) lineales de unidades de glucosa.



3.2.4 Tinción de los Geles. Las distintas actividades enzimáticas se revelan en los geles por tinción específica para cada una de las enzimas, los geles fueron teñidos basándose en las metodologías descritas por Selander²², excepto en las enzimas: catecol – 2,3 – oxigenasa a la cual se le aplicará la tinción descrita por RIUS²³; peroxidasa tinción descrita por DAVIS B.J.²⁴. y amilasa metodología descrita por Wormffordf y Favrel²⁵.

Terminado el proceso de electroforesis se procedió a realizar la tinción específica del gel. Para ello éste se sumergió en una solución tampón que contiene el/los sustrato/s y cofactores

²² SELANDER, RK. Y otros. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Populations Genetics and sistematica. 1986

²³ RIUS, N. Clonal population Structure of *Pseudomonas stutzeri*. 2001.

²⁴ DAVIS, B.J., "Electroforesis parte II" an N.Y. Acad. Sci.

²⁵ Wormffordf y Favrel. 2000

que requiere la enzima para presentar actividad y un colorante que revele la situación en donde la enzima ha reaccionado con el sustrato. Mediante esta tinción se pueden ver con facilidad las zonas de actividad enzimática como bandas bien definidas.

Todas las tinciones se realizaron dentro de una estufa a 37°C en agitación suave manteniendo condiciones de oscuridad, excepto dos enzimas Peroxidasa (PER1) y Amilasa (AMI) las cuales fueron teñidas a temperatura ambiente sin agitación y en presencia de luz.

En la mayoría de los casos, los principales constituyentes de la tinción fueron el sustrato de la enzima disuelto en un tampón, la coenzima necesaria (NAD⁺ o NADP⁺), el PMS (metosulfato de fenazina) y el MTT (dimetil tetrazolio). Durante la tinción se produjo la reducción del NAD⁺ a NADH ó del NADP⁺ a NADPH, liberándose un electrón que es captado por el PMS que actúa como aceptor de electrones. Esta reacción induce la reducción del MTT que da un compuesto azul insoluble que precipita o se deposita en forma de banda definida donde se produce actividad enzimática.

Las soluciones de NAD⁺ se preparan al 1% (1 g de o-nicotinamida adenina dinucleótido o NAD⁺ en 100 ml de agua destilada MP Biomedicals 100499). La solución de PMS se prepara al 1% (1 g de metosulfato de fenazina en 100 mL de agua destilada MP Biomedicals 100955) y la de MTT al 1.25% (1.25 g de dimetiltiazol tetrazoilo en 100mL de agua destilada MP Biomedicals 102227). Todas estas soluciones se mantienen a 4°C y protegidas de la luz.

A continuación se relacionan detalladamente la composición de cada uno de las soluciones de tinción para cada sistema enzimático estudiado. Las cantidades aquí descritas son para la tinción de dos gels del equipo *Mighty Small II SE250 / SE260*.

3.2.4.1 Sistema Peroxidasa (PER1)

Componente	Cantidad
Solución A	
Ácido acético glacial	14mL
Bencidina hidroclicrica	0.2 g
Agua destilada csp.	100mL
Solución B	
H ₂ O ₂ 0.6%	100mL

Para la tinción de este sistema enzimático, se preparó en el momento de usar una mezcla de proporciones iguales de la solución A y solución B (volumen final 30mL). Se esparció sobre el gel a temperatura ambiente y se lavó repetidas veces con agua destilada cuando se empezaron a observar las bandas.

3.2.4.2 Sistema Amilasa (AMI)

Componente	Cantidad
Buffer Fosfato pH 6.0	50mL
Lugol en ácido acético	Gotas
Agar 1 % y almidón 1% en tampón fosfato	30mL

La preparación del tampón fosfato esta descrita en el Anexo D.

Se incubó el gel a temperatura ambiente durante 10 min en buffer fosfato pH 6.0
Se esparció sobre el gel la solución de agar y almidón y se dejó reposar por 30 min.
Se quitó la capa de almidón, se lavó con agua destilada y se reveló con Lugol.

3.2.4.3 Catecol-2,3-oxigenasa (C230)

Componente	Cantidad
Pirocatecol	120mg
Tris / HCl 0,02M pH 7,0	40mL
Volumen final	40mL

La preparación del tampón Tris/HCl está descrita en el Anexo D.

Para realizar la tinción se depositó el gel sobre uno de los soportes de vidrio y se cubrió con papel de Filtro impregnado con la solución de tinción. Se realizó la tinción dentro de una estufa a 37°C, en agitación suave y en oscuridad. En la reacción que cataliza esta enzima se forma un compuesto de color amarillo, el semialdehído del ácido-2-hidroximucónico, que se visualizó directamente en el gel como una banda. Cuando empezaron a verse estas bandas en el gel, éste se sacó de la estufa, se retiró el papel de filtro y se decantó la solución de tinción que sobró. Después se dejó el gel a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno para que al favorecer la oxidación se observaran mejor las bandas.

No se puede parar la tinción porque el producto formado (semialdehído del ácido-2-hidroximucónico) es soluble en agua, y la lectura del gel ha de realizarse en el momento.

3.2.4.4 Malato deshidrogenasa (MDH)

Componente	Cantidad
L-ácido málico	78mg
Tris/ HCl 0,5M pH 7,1	11.6mL
Agua destilada	23.2mL
NaCN 0,1M	4mL
MTT	0.4mL
PMS	193.2uL
NAD	0.8 ml
Volumen Final	40mL

La preparación del tampón Tris / HCl está descrita en el Anexo D.

La solución de NaCN 0,1M se preparó disolviendo 49 g de cianuro sódico en 1L de agua destilada.

3.2.4.5 Alanina deshidrogenasa (ALD)

Componente	Cantidad
L-alanina	38.65mg
Tampón fosfato pH 7/0	38.65mL
MTT	386.5uL
PMS	193.2uL
NAD	773.0uL
Volumen final	40mL

La preparación del tampón fosfato esta descrita en el Anexo D.

3.2.4.6 Aspartato deshidrogenasa (ASD)

Componente	Cantidad
L-ácido aspártico	38.65mg
Tampón fosfato pH 7/0	38.65mL
MTT	386.5uL
PMS	193.2uL
NAD	773.0uL
Volumen final	40mL

La preparación del tampón fosfato está descrita en el Anexo D.

3.2.4.7 Lactato deshidrogenasa (LDH)

Componente	Cantidad
Lactato de sodio 60%	960.0uL
Tampón fosfato pH 7/0	37.8mL
MTT	377.4uL
PMS	188.7uL
NAD	754.7uL
Volumen final	40mL

Se adicionó al gel solución de tinte fresca, se tapó de inmediato envolviendo con papel aluminio y se incubó a 37°C por 60 minutos en oscuridad. El sustrato es altamente sensible a la luz.

3.2.5 Lectura de los geles. Esta no requiere del uso de técnicas específicas, ya que las bandas que aparecen sobre el gel después de la tinción enzimática se aprecian visualmente con facilidad.

Las diferentes movilidades electroforéticas para una misma enzima se denominan electromorfos, estas formas fueron denominadas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, siendo 1 la forma de mayor movilidad electroforética y 7 la de menor movilidad en geles de poliacrilamida (PAGE).

3.3 DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

El punto clave de la técnica de MLEE es que, admitiendo que las modificaciones en la movilidad electroforética de una enzima corresponden a mutaciones en el gen que codifica la proteína, cada uno de los electromorfos identificados para una determinada enzima puede ser equiparado a un alelo en el correspondiente locus estructural. De este modo, los resultados obtenidos pueden ser directamente correlacionados con el genotipo.

Cada aislado se identificó por una combinación de electromorfos o alelos para las distintas enzimas ensayadas. Esta secuencia de números enteros, que representa la numeración del alelo correspondiente a cada locus analizado constituye el genotipo multilocus o perfil de isoenzimas del aislado. De esta manera, se obtendrían tantos genotipos como aislados se analicen y tantos loci como enzimas se utilicen en el estudio. Los distintos genotipos identificados dentro de la población estudiada se designan como tipos electroforéticos (ETs). Asimismo, todas aquellos aislados que presenten movilidades electroforéticas iguales para todas las enzimas analizadas, es decir, que tienen el mismo genotipo multilocus, constituirán un mismo ET.

Estos datos son susceptibles de ser procesados por técnicas informáticas con la finalidad de establecer las relaciones existentes entre los diferentes aislados que forman el conjunto de la

muestra. La cuantificación de la diversidad genética se realizó con base en el número de variantes y con base en la frecuencia de variantes.

✓ Con base en el número de variantes

• Polimorfismo o tasa de polimorfismo (P_j). Un gen se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 ó 0.99

$$P_j = q \leq 0.95 \text{ ó } P_j = q \leq 0.99$$

P_j = tasa de polimorfismo

q = frecuencia alélica

Esta medida proporciona el criterio para determinar si un gen presenta variación; su cálculo se hace por observación directa respecto a si se cumple la definición o no se cumple. Por lo general, un gen polimórfico es aquel para el cual el alelo más común tiene una frecuencia de menos de 0.95. Los alelos raros o poco comunes se definen como aquellos cuyas frecuencias son menores a 0.005. El límite de la frecuencia alélica, que se fija en 0.95 (ó 0.99) es arbitrario, y su objetivo es ayudar a identificar aquellos genes en los cuales es común la variación alélica²⁶.

• Proporción de loci polimórficos. Es el número de loci polimórficos dividido por el número total de loci (polimórficos y monomórficos), es decir:

$$P = np_j / n_{\text{total}}$$

Donde,

P = la proporción de loci polimórficos

np_j = el número de loci polimórficos

n_{total} = el número total de loci

Expresa el porcentaje de loci variables en una población; su cálculo se basa en el conteo directo de los loci polimórficos y totales.

• Número promedio de alelos por locus. Es la suma de todos los alelos detectados en todos los loci, dividido por el número total de loci

$$n = (1/K) \sum_{i=1}^K n_i$$

K = el número de loci

n_i = el número de alelos detectados por locus

Esta medida brinda información complementaria a la información sobre polimorfismo. Requiere únicamente el conteo del número de alelos por locus y luego, el cálculo del promedio.

²⁶ CAVALLI-SFORZA, L. L. y W. F. Bodmer. 1981. Genética de las Poblaciones Humanas.

✓ Con base en la frecuencia de variantes

• Las frecuencias alélicas se calcularon sobre el total de aislados analizadas o tipos electroforéticos (ET) empleando para ello el paquete informático GENETIX versión 4.05.2²⁷. Si se analizan m loci para n aislados; las frecuencias de los distintos alelos obtenidos para cada uno de los loci estudiados se expresara como p_{ij} , es decir, como la frecuencia del alelo i en el locus j . La frecuencia obtenida nos indica la probabilidad de tener el alelo i en el locus j en la muestra estudiada.

• Diversidad genética por locus (h^*). La diversidad genética para cada loci ensayado fue calculada de acuerdo con Nei (1978), utilizando su factor de corrección para muestras pequeñas. Se define como la probabilidad de que dos aislados o ETs, elegidos al azar en la población estudiada, difieran (presenten alelos distintos) en un locus determinado j . Se expresa como:

$$h^* = \frac{(1 - \sum_i p_{ij}^2) \cdot n}{n - 1}$$

p_{ij} = es la frecuencia del alelo i en el locus j .

n = es el numero total de aislado o ETs.

$n / n-1$ = es el factor de corrección que se aplica a muestras pequeñas.

• Diversidad genética media (H). Es la media aritmética de h^* para los m loci ensayados, y se calcula así:

$$H = \frac{\sum_j h^*}{m}$$

Siendo m el número de loci²⁸.

✓ Construcción de dendogramas. La distancia genética entre pares de ETs se calculó como la proporción de loci en los que no existe concordancia en los alelos. Con estas distancias se genero una matriz de coeficientes de distancias utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair – Group Method for arithmetic Averages), y con el programa PHYLIP29 se construyó dendogramas para visualizar las relaciones existentes entre los distintos aislados estudiados. Para los dendogramas generados se calculó el coeficiente de correlación cofenética (rc), usando el programa NTSYS-pc, versión 2.030.

²⁷ BELKHIR, K., 2004. GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations.

²⁸ MAYNARD SMITH, J. y col., 1993. How clonal are bacteria? USA 90.

²⁹ FELSENTSTEIN, J., 1993. PHYLIP package, version 3.6. Seattle, WA: University of Washington

³⁰ ROLF, F.J., 1993. Numerical taxonomy and multivariate analysis (NTSYS), version 2.0. New York: Exeter Software.

4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA BACTERIA

Los aislados del genero *Rhizobium* estudiados en la presente investigación se caracterizaron por ser bacterias de crecimiento rápido de 3 - 4 días incubadas a 26°C, se observaron colonias típicas, cuya forma varió entre planas y convexas, gomosas, suaves, brillantes y de color blanco lechoso. Mediante Tinción de Gram se corroboró que se trataban de bacilos Gram negativos.

En la siguiente tabla se muestran los aislados seleccionados y purificados con el lugar de procedencia, el código de referencia del aislado y el pH del suelo de donde fueron aislados.

Tabla 8. Relación de aislados estudiados con la técnica MLEE

LOCALIDAD	CÓDIGO DEL AISLADO	pH SUELO	LOCALIDAD	CÓDIGO DEL AISLADO	pH SUELO
Yacuanquer	Y136	5,1	Guaitarilla	G33	5,1
Yacuanquer	Y116	5,3	Tangua	T60	4,9
Yacuanquer	Y137	5,1	Tangua	T62	6,0
Funes	F95	5,3	Tangua	T58	4,9
Funes	F107	4,7	Córdoba	C85	4,7
Funes	F108	5,8	Córdoba	C83	5,8
Imués	I17	5,8	Córdoba	C89	4,7
Imués	I48	5,8	Carlosama**	Ca01	6,0
Imués	I37	4,9	Carlosama**	Ca09	4,7
Pasto	Pt01	5,8	Carlosama**	Ca11	5,3
Pasto	Pt17	6,0	Puerres**	Pu06	4,9
Pasto	Pt16	6,0	Puerres**	Pu07	4,9
Peñol	LFBN3*	Desc	Puerres**	Pu08	4,9
Peñol	LFBN1*	Desc	Iles**	IL13	5,3
Peñol	LFBN2*	Desc	Iles**	IL12	5,3
Guaitarilla	G27	5,1	Iles**	IL14	5,3
Guaitarilla	G30	4,7			

* Aislados caracterizados en: DELGADO, Lucia F. y GUEVARA, Claudia S. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Phaseoli* mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos. Universidad de Nariño. Programa de Química. 2003.

** Bacterias aisladas en el desarrollo de esta investigación.

4.2 DETERMINACION DE PERFILES ISOENZIMATICOS

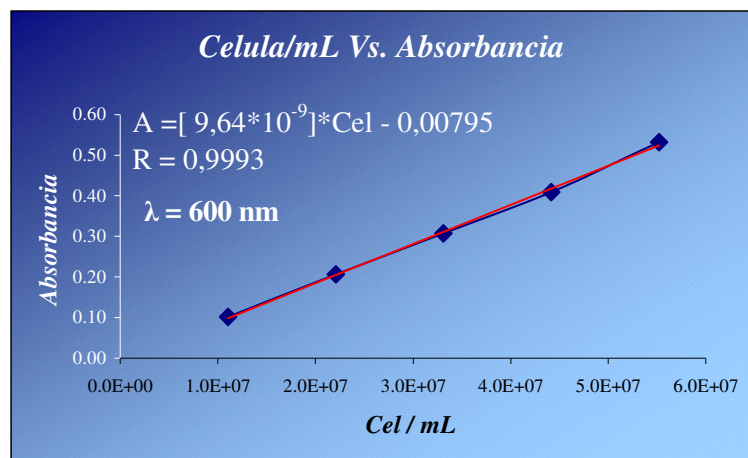
4.2.1 Obtención de los extractos citoplasmáticos. Una vez verificado que la densidad celular de cada uno de los inóculos era correcta, se procedió a realizar la lisis. Se ensayaron diferentes métodos; congelación-descongelación, método abrasivo y la combinación de los

dos que arrojaron resultados inapropiados para el desarrollo de esta investigación; por ello se resolvió combinar un método enzimático empleando lisozima con el método abrasivo descrito en el apartado 3.2.1. La lisozima es una enzima que rompe el enlace beta glucosídico del peptidoglicano mureína, y que produce la destrucción de la pared celular y deja al protoplasma de las bacterias rodeado únicamente por la membrana celular ("protoplasto"), lo cual convierte a la bacteria en un organismo extraordinariamente sensible a las variaciones del medio³¹; los resultados obtenidos al realizar esta modificación fueron satisfactorios.

Se realizaron además dos puntos de control para garantizar una concentración proteica mínima que permitiera la detección de actividad enzimática con la técnica MLEE.

4.2.1.1 Densidad celular en el medio de cultivo. En el primer punto de control se determinó la lectura espectrofotométrica de las bacterias suspendidas en el medio líquido TY, para comprobar que la densidad celular fuera igual o superior a $4 * 10^7$ células/mL, y verificar que existiera una cantidad mínima de bacterias antes de lisarlas; la lectura se efectuó a una longitud de onda de 600nm³², las muestras que presentaron absorbancias comprendidas en el rango de 0.300 - 0.500 fueron las seleccionadas para realizar la lisis; la curva de calibración construida se muestra en la siguiente figura.

Figura 6. Curva de calibración para densidad celular.



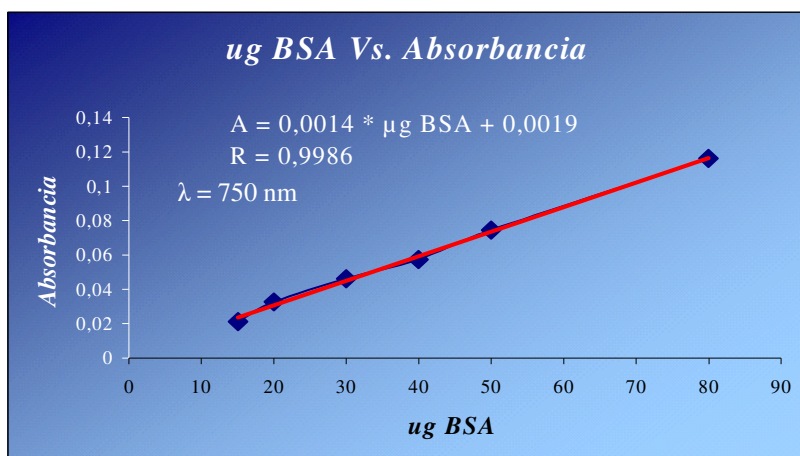
4.2.1.2 Concentración proteica de los extractos. El segundo punto de control se basó en determinar la concentración proteica de los extractos mediante el uso del método de Lowry modificado (apartado 3.2.2). La concentración de proteína se estimó por comparación directa de la absorbancia de las muestras con la curva de calibración realizada con diferentes concentraciones de BSA. Se rechazaron los extractos con concentraciones inferiores a 2

³¹ SAENZ, CH. Hipertexto del área de la Biología "La pared Bacteriana". Facultad de Agroindustria. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina 1998 – 2005.

³² SOMASEGARAN, Op. Cit., p. 21

µg/µL, de tal manera se garantizó que al realizar las tinciones de los geles se consiguiera apreciar fácilmente las bandas de actividad enzimática.

Figura 7. Curva de calibración para determinación de proteína



Una vez determinada la concentración de proteína se obtuvieron valores en el rango de 2.7 – 33.7 µg/µL; un rango amplio a pesar de que todas las muestra recibieron igual tratamiento, esto puede deberse a las características fisiológicas de cada aislado que le confieren resistencia al proceso de lisis.

Tabla 9. Concentración proteica de los extractos citoplasmáticos.

LOCALIDAD	CÓDIGO AISLADO	CONCENTRACIÓN PROTEICA µg/µL	LOCALIDAD	CÓDIGO AISLADO	CONCENTRACIÓN PROTEICA µg/µL
Yacuanquer	Y136	12.6	Guaitarilla	G33	4.9
Yacuanquer	Y116	4.4	Tangua	T60	23.9
Yacuanquer	Y137	12.7	Tangua	T62	15.7
Funes	F95	14.9	Tangua	T58	8.6
Funes	F107	8.2	Córdoba	C85	4.7
Funes	F108	16.4	Córdoba	C83	13.6
Imués	I17	10.6	Córdoba	C89	10.9
Imués	I48	2.7	Carlosama	Ca01	10.3
Imués	I37	9.7	Carlosama	Ca09	9.9
Pasto	Pt01	19.4	Carlosama	Ca11	33.7
Pasto	Pt17	7.2	Puerres	Pu06	14.0
Pasto	Pt16	5.6	Puerres	Pu07	14.6
Peñol	LFBN3	11.6	Puerres	Pu08	13.0
Peñol	LFBN1	19.4	Iles	I113	13.0
Peñol	LFBN2	10.8	Iles	I112	6.9
Guaitarilla	G27	20.0	Iles	I114	9.9
Guaitarilla	G30	15.3			

4.2.2 inción y lectura de los geles Después de llevar los extractos citoplasmáticos a electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo al apartado 3.2.4, estos fueron sometidos al proceso de tinción específica. En las figuras 15 a 20 se observan las actividades enzimáticas de cada locus en las cuales se aprecian bandas bien definidas y diferentes electromorfos.

Figura 8. Actividad de la enzima peroxidasa. (PER1)

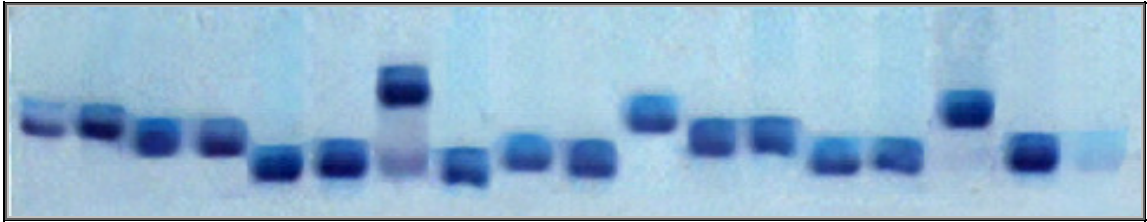


Figura 9. Actividad de la enzima amilasa (AMI)

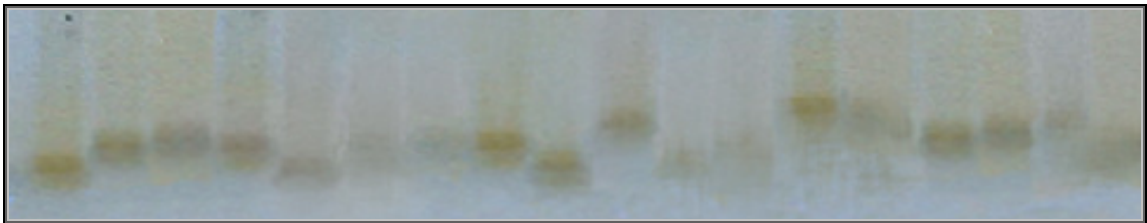


Figura 10. Actividad de la enzima catecol,2-3,oxigenasa (C23O)



Figura 11. Actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH)

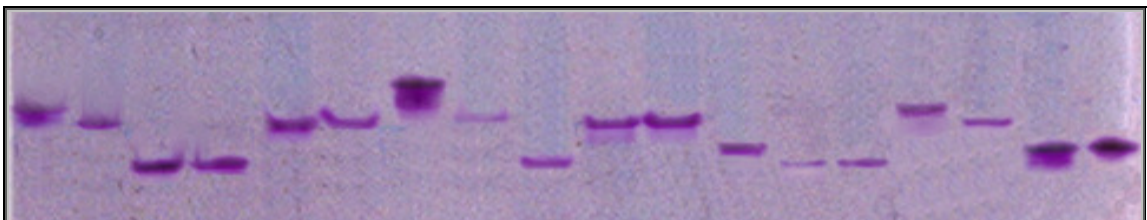


Figura 12. Actividad de la enzima alanina deshidrogenasa (ALD)

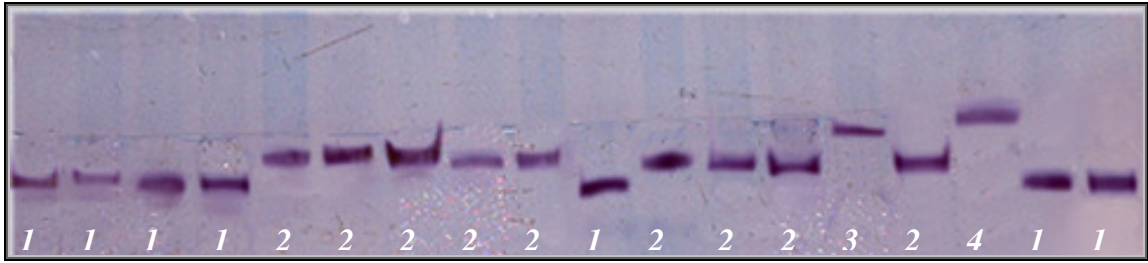


Figura 13. Actividad de la enzima aspartato deshidrogenasa (ASD)



4.2.3 Tipos electroforéticos detectados. El análisis de isoenzimas multilocus se realizó con un total de 33 aislados de *Rhizobium spp*, analizándose la actividad enzimática de 7 enzimas metabólicas.

Los tipos electroforéticos (ETs) fueron determinados de acuerdo con las formas electroforéticas (alelos) encontrados para cada uno de los aislados evaluados. Cada ET consta de siete alelos representado cada uno por un número, que identifican en orden a: PER1, AMI, C23O, MDH, ALD, ASD y LDH.

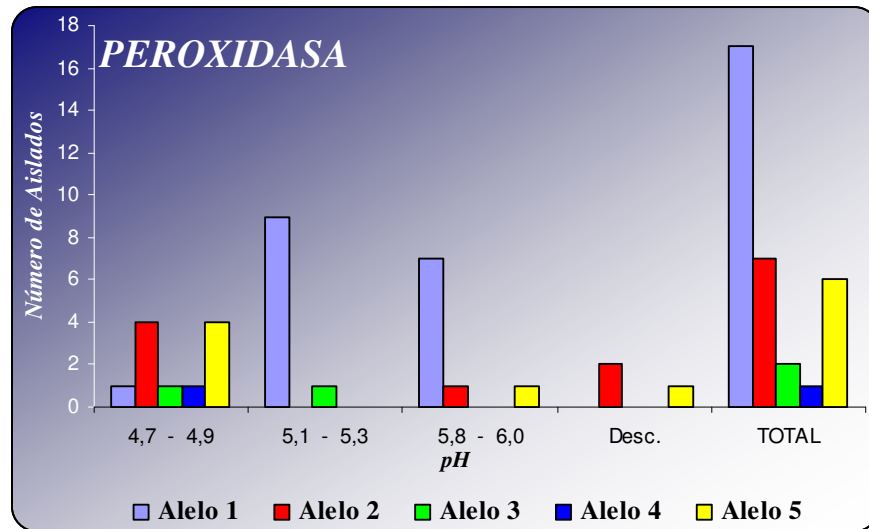
Tabla 10. Perfiles de isoenzimas obtenidos para cada uno de los aislados.

ETs	CÓDIGO AISLADO	ALELOS EN CADA LOCUS						
		PER1	AMI	C23O	MDH	ALD	ASD	LDH
1	Y136	3	4	1	4	1	4	2
2	Y116	1	3	1	3	1	2	2
3	Y137	1	6	1	3	1	5	2
4	F95	1	3	1	2	1	5	6
5	F107	3	7	4	1	2	2	3
6	F108	1	5	1	3	2	4	3
7	I17	1	1	1	2	2	4	3
8	I48	1	3	2	1	2	4	4
9	I37	5	3	2	1	1	4	1
10	Pt01	1	2	5	1	2	4	1
11	Pt17	1	4	5	4	2	2	1
12	Pt16	1	4	5	3	2	3	5
13	LFBN3	5	3	4	3	3	3	1
14	LFBN1	2	3	4	2	2	4	1
15	LFBN2	2	3	4	1	4	5	7
16	G27	1	3	2	3	1	2	2
17	G30	2	2	1	1	3	5	1
18	G33	1	1	2	3	1	2	1
19	T60	5	3	6	1	3	2	3
20	T62	2	4	5	3	1	3	1
21	T58	2	6	6	3	3	4	1
22	C85	5	3	1	4	3	3	1
23	C83	5	4	1	3	2	3	3
24	C89	4	3	1	1	2	5	1
25	Ca01	1	4	3	2	3	3	5
26	Ca09	5	3	3	2	1	4	1
27	Ca11	1	3	3	2	1	5	2
28	Pu06	2	3	1	3	3	1	1
29	Pu07	2	3	4	2	3	4	1
30	Pu08	1	3	3	3	3	5	1
31	II13	1	3	5	3	4	1	6
32	II12	1	4	3	3	4	1	2
33	II14	1	4	3	3	4	1	6

4.2.4 Movilidad de electromorfos. Los 33 aislados fueron caracterizados de acuerdo con su ET utilizando los perfiles obtenidos para las siete enzimas evaluadas. El análisis se realizó agrupando los aislados de acuerdo con el pH del suelo del cual fue aislada la bacteria.

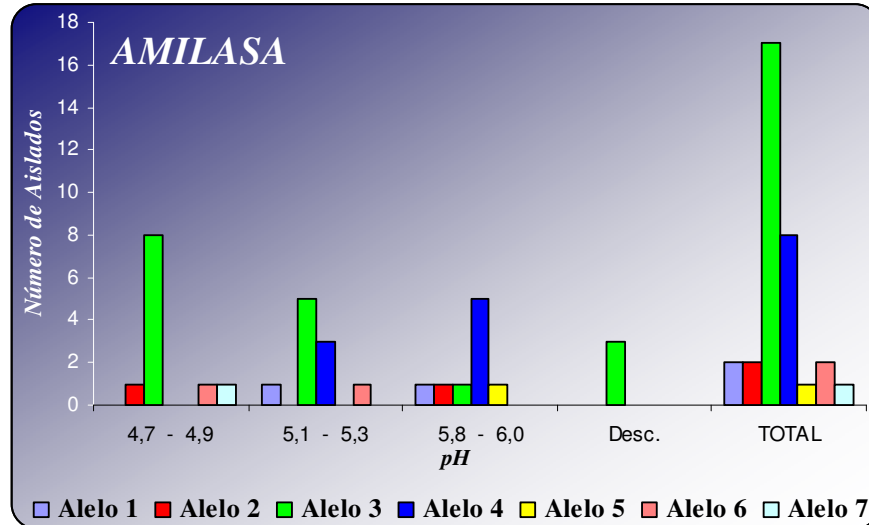
4.2.4.1 Peroxidasa (PER1). Se detectaron cinco formas electroforéticas para esta enzima dentro de la población evaluada de *Rhizobium spp.* Estas formas se denominaron 1, 2, 3, 4 y 5; siendo 1 la de mayor movilidad y 5 la de menor movilidad, en geles de poliacrilamida (PAGE). El alelo mas frecuentemente detectado fue el alelo 1 (17 aislados / 33) seguido por 2 (7/33), 5 (6/33), 3 (2/33) y el alelo 4 (1/33).

Figura 14. Movilidad de electromorfos para la enzima peroxidasa.



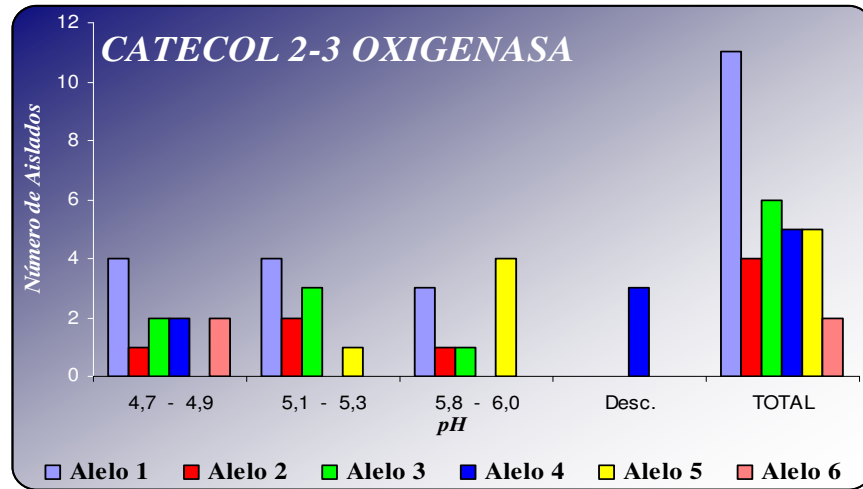
4.2.4.2 Amilasa (AMI). Fueron detectados siete alelos; alelo 3 fue el más frecuente (17/33).

Figura 15. Movilidad de electromorfos para la enzima amilasa.



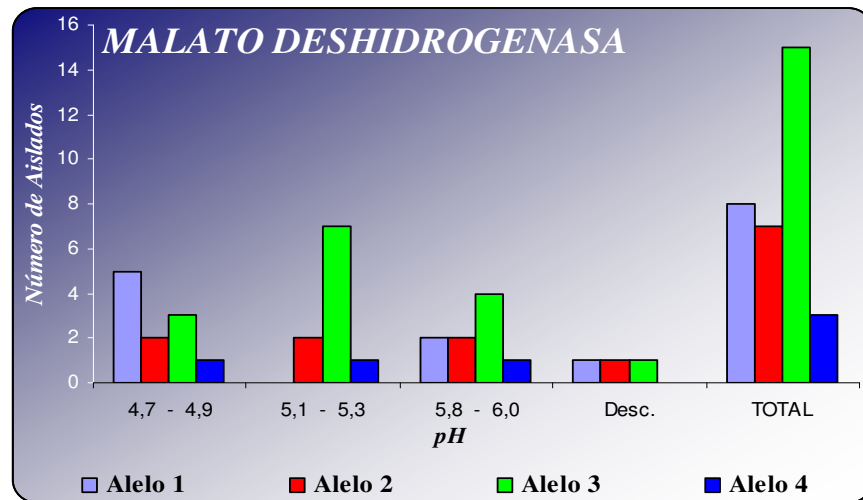
4.2.4.3 Catecol 2, 3 oxigenasa (C23O). Para este sistema enzimático fueron observados 6 alelos, de los cuales el alelo 1 fue el más frecuente (11/33).

Figura 16. Movilidad de electromorfos para la enzima catecol 2,3 oxigenasa



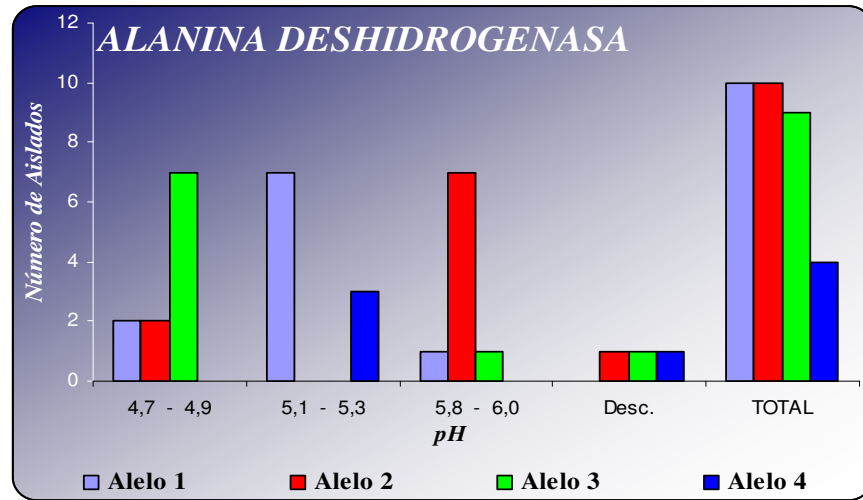
4.2.4.4 Malato Deshidrogenasa (MDH). Cuatro alelos fueron observados, el mas frecuente es el alelo 3 (15/33).

Figura 17. Movilidad de electromorfos para la enzima malato deshidrogenasa.



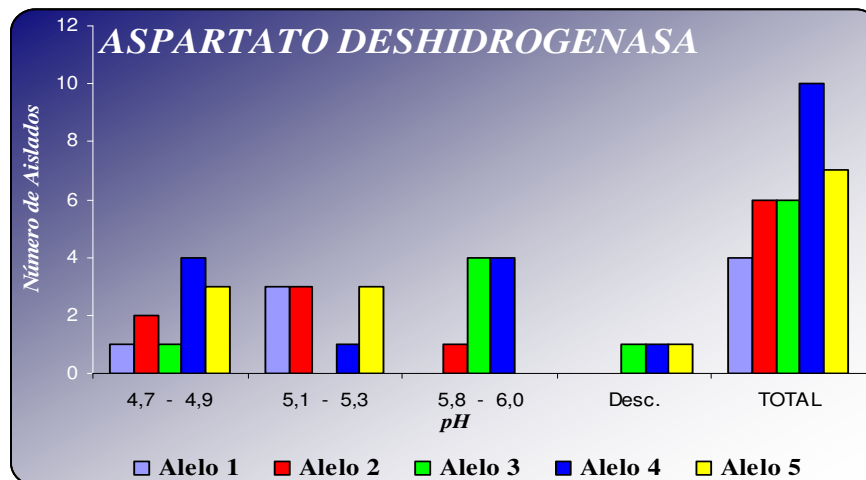
4.2.4.5 Alanina Deshidrogenasa. Al igual que en MDH se detectaron únicamente 4 alelos, siendo estas las menos polimórficas dentro de esta investigación. Los alelos más frecuentes fueron el alelo 1 y el alelo 2 (10/33).

Figura 18. Movilidad de electromorfos para la enzima alanina deshidrogenasa.



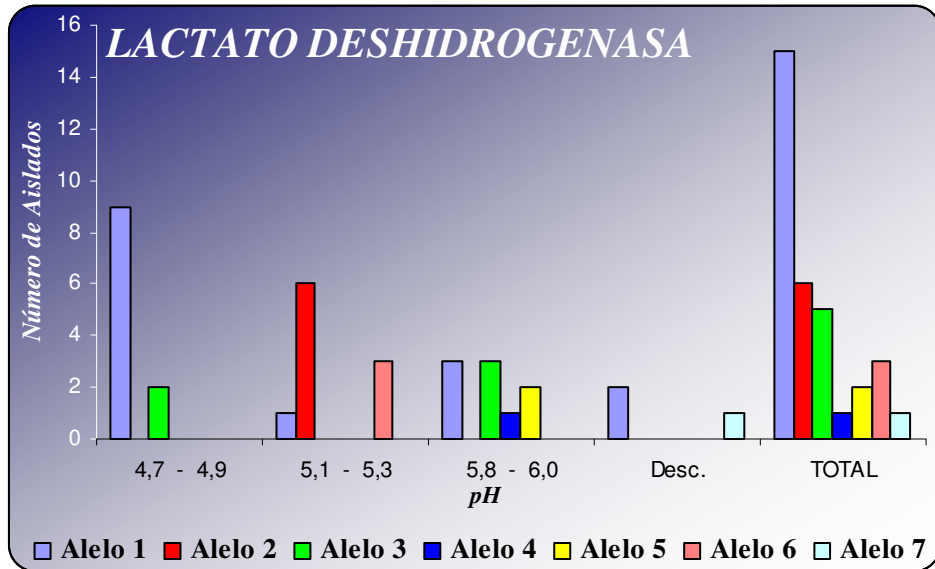
4.2.4.6 Aspartato Deshidrogenasa. Fueron observados 5 alelos, el mas frecuente es el alelo 4 (10/33).

Figura 19. Movilidad de electromorfos para la enzima aspartato deshidrogenasa.



4.2.4.7 Lactato Deshidrogenasa. Es un locus muy polimórfico en el cual se observaron siete alelos, de los cuales el mas frecuente fue el alelo 1 (15/33).

Figura 20. Movilidad de electromorfos para la enzima Lactato deshidrogenasa.



Los resultados de las movilidades en los diferentes sistemas enzimáticos permiten inferir que existe una relación entre la movilidad electroforética de los alelos y el pH del suelo; así, para las enzimas peroxidasa (PER1), catecol 2,3 oxigenasa (C23O) y aspartato deshidrogenasa (ASD) se observaron un mayor numero de formas electroforéticas en el rango de pH 4,7 – 4,9 (5/5, 5/6 y 5/5 electromorfos respectivamente); para las enzimas amilasa (AMI) y lactato deshidrogenasa (LDH) 5/7 y 4/7 electromorfos respectivamente en el rango de pH 5,8 – 6,0; sin embargo, para las enzimas malato deshidrogenasa (MDH) y alanina deshidrogenasa (ALD) fueron evidenciados dos rangos de pH (4,7 - 4,9 y 5,8 – 6,0) en los cuales se presentaron mayor numero de formas electroforéticas (4/4). Con esta información se puede deducir que para cada sistema enzimático existe un rango de pH que provoca un aumento en la tasa de polimorfismo, en el tipo de aislados estudiados.

4.3 DETERMINACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA

4.3.1 Variabilidad alélica por locus. Todos los loci estudiados fueron polimórficos, y el número de alelos por locus osciló entre 4, para las enzimas malato deshidrogenasa y alanina deshidrogenasa, y 7 para las enzimas lactato deshidrogenasa y amilasa. El número medio de alelos por locus fue 5.43 lo que refleja una alta variabilidad alélica.

Tabla 11. Variabilidad alélica obtenida con la técnica MLEE para el conjunto de aislados de *Rhizobium spp.*

	VALOR OBSERVADO
Número de aislados	33
Número de loci	7
Número de ETs	33
Número total de alelos	38
Número mínimo de alelos / locus	4 (MDH y ALD)
Número máximo de alelos / locus	7 (LDH y AMI)
Proporción de loci polimórficos	75.3 %
Número medio de alelos / locus	5.43

Las enzimas analizadas presentan una alta variabilidad alélica, de 4 a 7 alelos por locus, respecto a lo reportado por RAMIREZ, M 2 a 6 alelos por locus para cuatro loci con un número medio de alelos por locus de 3.5, lo que significa que las enzimas evaluadas en dicho trabajo resultaron menos polimórficas que las reportadas en esta investigación.

La frecuencia alélica se define como una medida de la presencia de un alelo dado en una población; es decir, la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que corresponden específicamente a ese tipo, un alelo es una forma alterna de un gen. Si un gen corresponde a una secuencia específica de nucleótidos a lo largo de una molécula de ADN, los alelos representan las diferentes secuencias de nucleótidos que son posibles para ese locus específico.

El término “gen” muchas veces se utiliza como sinónimo de “alelo” y, en consecuencia, a veces la expresión “frecuencia génica” se usa como sinónimo de “frecuencia alélica”. Las diferencias alélicas en un locus único en una población indican variación genética. Esta variación genética deber ser cuantificada para los diferentes genes y para los diferentes individuos o poblaciones.

Tabla 12. Frecuencias alélicas para el total de la muestra estudiada (33 ETs)

ALELO	FRECUENCIA DEL ALELO I EN EL LOCUS J						
	PER1	AMI	C23O	MDH	ALD	ASD	LDH
1	0,5152	0,0606	0,3333	0,2424	0,3030	0,1212	0,4545
2	0,2121	0,0606	0,1212	0,2121	0,3030	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	0,3030	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

Como se puede observar en la tabla todas las frecuencias alélicas son menores de 0.95 lo que indica que todos los loci encontrados son polimórficos.

4.3.2 Diversidad genética. En la siguiente tabla se muestran los valores de diversidad genética por locus y diversidad genética media de acuerdo a la ecuación de Nei 1978, teniendo en cuenta todos los aislados analizados o solo los tipos electroforéticos; los valores obtenidos son idénticos y por ello se tomaran como referentes de la muestra estudiada los obtenidos considerando solo los ETs identificados con la técnica MLEE.

Tabla 13. Diversidad genética por locus y diversidad genética media para la muestra.

LOCUS	DIVERSIDAD GENÉTICA POR LOCUS (h*)	
	ETs (33)	AISLADOS (33)
PER1	0.641	0.641
AMI	0.652	0.652
C23O	0.785	0.785
MDH	0.671	0.671
ALD	0.719	0.719
ASD	0.776	0.776
LDH	0.715	0.715
	DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIA (H)	
	ETs	AISLADOS
	0.708	0.708

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos considerando solo tipos electroforéticos, la diversidad genética por locus osciló 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, M³³. $H = 0.598$. Esto indica que existe una mayor diferenciación genética entre los aislados rizobiales del departamento de Nariño, estudiados en esta investigación.

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.

³³ RAMIREZ, M., Op. Cit., p. 17

Tabla 14. Diversidad genética de *Rhizobium spp* agrupados de acuerdo a la localidad.

LOC.	DA	PER1		AMI		C23O		MDH		ALD		ASD		LDH		PROMEDIO	
		A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	H	ETs
Yacían.	13	2	0,427	3	0,656	1	0,000	2	0,427	1	0,000	3	0,656	1	0,000	0,310	3
Funes	17	2	0,427	3	0,656	2	0,427	3	0,656	2	0,427	3	0,656	2	0,427	0,525	3
Imuez	14	2	0,427	2	0,427	2	0,427	2	0,427	2	0,427	1	0,000	3	0,656	0,399	3
Pasto	13	1	0,000	2	0,427	1	0,000	3	0,656	1	0,000	3	0,656	3	0,427	0,310	3
Peñol	15	2	0,427	1	0,000	1	0,000	3	0,656	3	0,656	3	0,656	2	0,427	0,403	3
Guait.	15	2	0,427	3	0,656	2	0,427	2	0,427	2	0,427	2	0,427	2	0,427	0,460	3
Tangua	16	2	0,427	3	0,656	2	0,427	2	0,427	2	0,427	3	0,656	2	0,427	0,493	3
Córdoba	14	2	0,427	2	0,427	1	0,000	3	0,656	2	0,427	2	0,427	2	0,427	0,399	3
Carlota	13	2	0,427	2	0,427	1	0,000	1	0,000	2	0,427	3	0,656	3	0,656	0,371	3
Puerres	13	2	0,427	1	0,000	3	0,656	2	0,427	1	0,000	3	0,656	1	0,000	0,310	3
Iles	10	1	0,000	2	0,427	2	0,427	1	0,000	1	0,000	1	0,000	2	0,427	0,183	3

A: Numero de alelos o formas electroforéticas

h*: Diversidad genética.

DA: Diversidad alélica (riqueza alélica)

Loc: Localidad

La diversidad genética varió en las localidades de 0 a 0.427 para PER1, de 0 a 0.656 para AMI, C23O, MDH, ALD, ASD y para LDH. La diversidad genética media varió entre 0.183 que corresponde a Iles y 0.525 que corresponde a la localidad de Funes; representando la variabilidad más alta para la muestra estudiada.

Cuando el pH del suelo fue el parámetro para agrupar los aislados, la diversidad genética para PER1 vario entre: 0.154 y 0.702; para AMI el rango observado fue de 0 a 0.631, para C23O la variación se presentó entre 0 a 0.753, para MDH entre 0.443 a 0.682, para ALD la variación observada osciló entre 0.351 a 0.656; para ASD el rango fue de 0.580 a 0.736 y para LDH el rango fue de 0.276 a 0.707. La diversidad genética media varió entre 0.403 para los suelos con pH desconocido lo que refleja menos diversidad genética y 0.582 para los suelos del grupo I. (Rango de pH [4.7: 4.9]), siendo este el grupo con mayor diversidad genética.

Tabla 15. Diversidad genética de aislados de *Rhizobium spp* agrupadas de acuerdo al pH

PH	PER1		AMI		C23O		MDH		ALD		ASD		LDH		PROMEDIO	
	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	A	h*	H	ETs
G I	5	0,702	4	0,429	5	0,753	4	0,668	3	0,514	5	0,736	2	0,276	0,582	11
G II	2	0,154	4	0,629	4	0,691	3	0,443	2	0,402	4	0,711	3	0,526	0,508	10
G III	3	0,351	5	0,631	4	0,656	4	0,682	3	0,351	3	0,580	4	0,707	0,565	9
Desc.	2	0,427	1	0,000	1	0,000	3	0,656	3	0,656	3	0,656	2	0,427	0,403	3

G I: Grupo rango de pH 4,7-4,9

G II: Grupo rango de pH 5,1-5,3

G III: Grupo rango de pH 5,8-6,0

Desc: Desconocido.

De acuerdo a la información brindada por la tabla anterior, se puede observar que 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 mas 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.

Según RAMIREZ, M. "...la diversidad genética promedio de los aislados vario de 0.48 a 0.66 para el pH del suelo y de 0.33 a 0.68 para localidades, mostrando valores similares a los obtenidos por Young (1985) y por Harrison (1989a) quienes obtuvieron valores cercanos a 0.50 y por Mohd – Saud (1990) quien obtuvo valores entre 0.27 y 0.43..."³⁴. Estos valores son comparables a los obtenidos en esta investigación, con diversidades genéticas promedio de 0.183 a 0.525 para localidades y 0.403 a 0.582 para pH del suelo. En la tabla se comparan los valores calculados de diversidad genética media para distintos grupos de aislados formados a partir de la muestra inicial.

Tabla 16. Comparación de los valores de diversidad genética media entre diferentes subgrupos de la muestra estudiada.

	No. ETS	NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS	DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIA (H)
Total 33 aislados	33	5,43	0,708
Agrupados por localidad u origen geográfico			
Yacuanquer	3	1,86	0,310
Funes	3	2,43	0,525
Imuez	3	2,00	0,399
Pasto	3	1,86	0,310
Peñol	3	2,14	0,403
Guaitarilla	3	2,14	0,460
Tangua	3	2,29	0,493
Córdoba	3	2,00	0,399
Carlosama	3	2,00	0,371
Puerres	3	1,86	0,310
Iles	3	1,43	0,183
Agrupados por pH del suelo			
pH 4.7 – 4.9	11	4.00	0,582
pH 5.1 – 5.3	10	3.14	0,508
pH 5.8 – 6.0	9	3.71	0,565
Desconocido	3	2.14	0,403
Dendograma por ETs (ver figura 22)			
Division I	14	4.28	0,585
Division II	10	3.14	0,510
Division III	9	3.71	0,565

³⁴ RAMIREZ, M., Op. Cit., p. 17

4.3.3 Representación gráfica de los resultados MLEE.

A partir de las frecuencias alélicas obtenidos aplicando la técnica MLEE (Tabla 10), y por comparación entre parejas de ETs de la concordancia o no concordancia de alelos en cada uno de los locus, se construyó una matriz de coeficientes de distancias que fue la base para generar un dendograma con el programa informático PHYLIP³⁵, utilizando el método UPGMA.

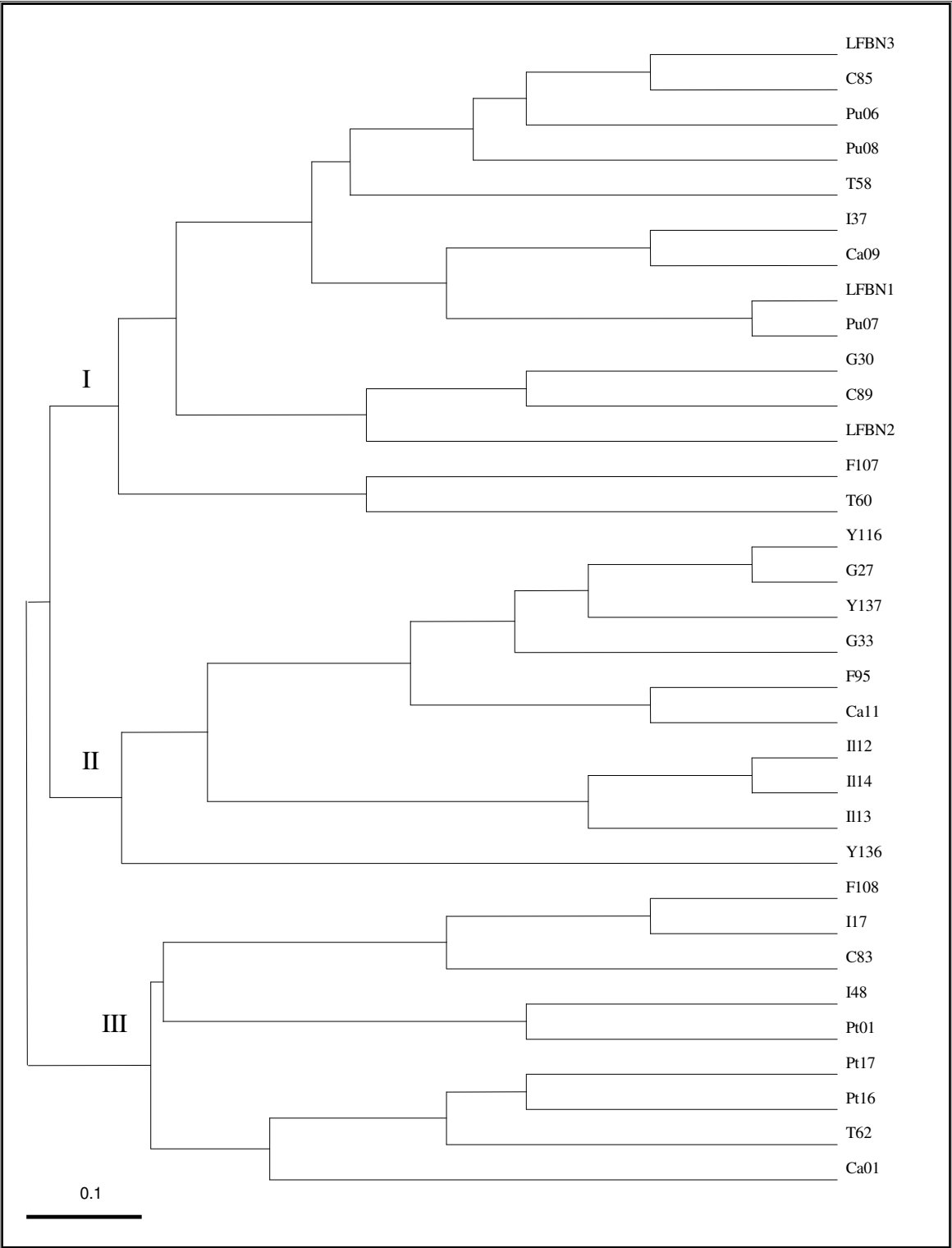
4.3.3.1 Dendograma generado de acuerdo al tipo electroforético. El dendograma obtenido del análisis por conglomerado para las isoenzimas estudiadas se muestra en la Figura 21, y representa las relaciones genéticas existentes entre los diferentes tipos electroforéticos, y por tanto, entre los diferentes aislados analizados en el estudio. Este dendograma; sin embargo, no muestra un agrupamiento significativo de los aislados de *Rhizobium spp.* en relación a la localidad de aislamiento, pero cuando se agrupan de acuerdo al pH del suelo del que se aislaron, si existen relaciones lo que significa que el pH es un factor influyente en la estructura genética de la especie estudiada.

El coeficiente de correlación cofenético (r_c) que indica el grado de similitud entre las distancias genéticas de los microorganismos estudiados y las distancias fenéticas obtenidas a partir del dendograma; para el total de la muestra fue de 0,532 lo que representa que el 53,2% de la diversidad genética obtenida está explicada por las relaciones expresadas en el dendograma.

El dendograma se subdividió en tres grandes clusters: I, II y III; III se separa de I y II a una distancia genética de 0.488. El grupo I que contiene el mayor número de ETs (14) se caracteriza por incluir aislados de *Rhizobium spp* de suelos con pH ácido, en un rango de 4.7 – 4.9 además de los aislados de pH desconocido. La división II contiene 10 ETs caracterizada de igual manera por contener aislados de suelos con pH comprendidos entre 5.1 – 5.3; finalmente la división III representada por 9 ETs, y que abarca aislados de *Rhizobium spp* de suelos con rango de pH 5.8 – 6.0, y que además divergen a una distancia genética de 0.488, respecto a las otras dos divisiones separándose evidentemente del resto de aislados analizados.

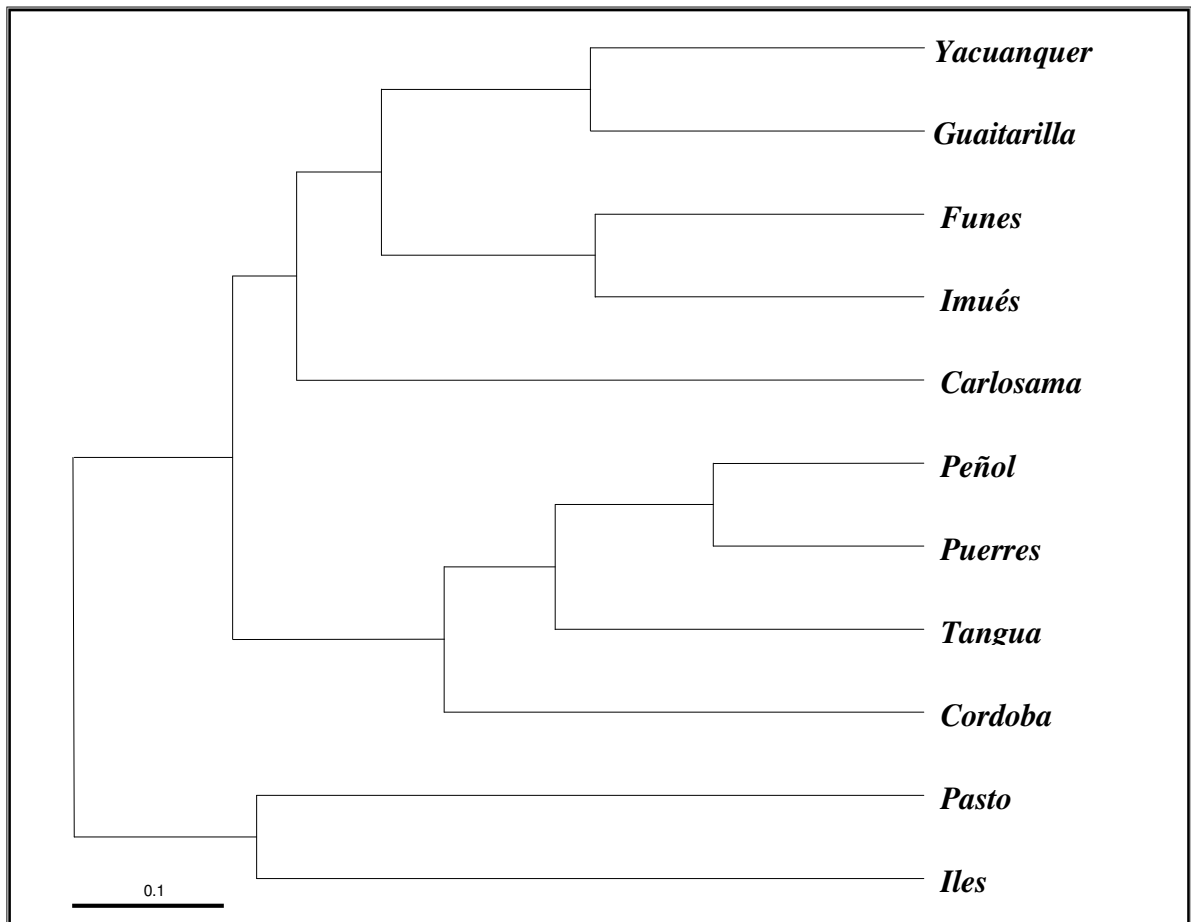
³⁵ FELSENTSTEIN, J., Op. Cit., p. 47

Figura 21. Dendograma de relaciones genéticas entre los 33 ETs.



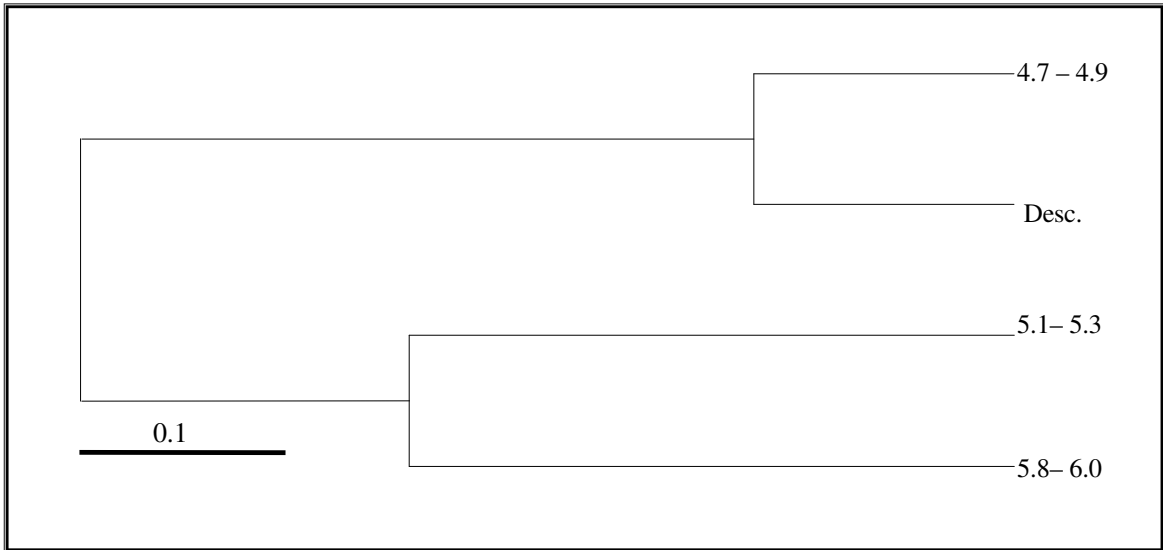
4.3.3.2 Dendograma generado de acuerdo a la localidad de aislamiento. El agrupamiento que se observa en el dendograma generado no exhibe una relación lógica entre las localidades de aislamiento, ya que se esperaría que entre localidades cercanas geográficamente existiera una distancia fenética pequeña y por ello se dice que el agrupamiento no es representativo. Pese a esto 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 está explicada por las relaciones expresadas en el siguiente dendograma.

Figura 22. Dendograma de relaciones genéticas entre aislados según las localidades.



4.3.3.3 Dendograma generado de acuerdo al pH del suelo. Finalmente 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 está explicada por las relaciones expresadas en el siguiente dendograma.

Figura 23. Dendograma de relaciones genéticas entre aislados según el pH del suelo.



En el dendograma generado de acuerdo al tipo electroforético se aprecia que los aislados correspondientes a la localidad del Peñol y que poseen una alta capacidad infectiva y realizan el proceso de fijación biológica de nitrógeno de manera efectiva de acuerdo a DELGADO, L.³⁶ se encuentran en la división I, con 11 ETs mas; esto podría significar que dichos aislados comparten las características infectivas – efectivas, de los aislados del municipio del Peñol.

³⁶ DELGADO, Lucía F. y GUEVARA, Claudia S. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Phaseoli* mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos. 2003.

5. CONCLUSIONES

1. Se estudió la variabilidad genética de 33 aislados de *Rhizobium spp*, procedentes de diferentes localidades del departamento de Nariño, y agrupados de acuerdo al pH del suelo; mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE), los 7 loci analizados fueron polimórficos.
2. Mediante la técnica de MLEE se ha evidenciado la existencia de 33 tipos electroforéticos o ETs para la muestra estudiada.
3. La muestra analizada exhibe un polimorfismo del 75.3% lo que conllevó a que la variabilidad genética promedio entre los aislados fuera alta. La localidad que presentó mayor riqueza alélica fue Funes.
4. La enzima catecol 2,3 oxigenasa (C23O) presentó una diversidad 0.785 siendo esta la mas alta; la localidad con mayor diversidad genética fue Funes ($H = 0.525$). El valor de la diversidad genética media fue de 0.708 lo que indica que la tasa evolutiva de la especie *Rhizobium spp* es alta.
5. Al observar los valores de diversidad genética media para la muestra agrupada de acuerdo al pH del suelo del cual fueron aisladas las bacterias, se advierte que la diversidad genética aumenta de acuerdo a ciertos rangos de pH, de acuerdo al loci analizado.
6. La estructura de los dendogramas sugiere que las relaciones genéticas entre aislados son muy bajas; el coeficiente de correlación cofenético sustenta que el dendograma generado de acuerdo al pH del suelo, es el que mejor representa las distancias genéticas obtenidas.

RECOMENDACIONES

1. La estrategia de recolección de los aislados debería orientarse hacia el muestreo de más plantas infectadas por cada localidad, con el propósito de hacer más representativo el estudio genético de *Rhizobium spp.*
2. Adaptar la técnica empleada en el desarrollo de este trabajo, electroforesis de enzimas multilocus MLEE a la identificación y caracterización de otros microorganismos de importancia.
3. Evaluar la infectividad y la efectividad de los 30 aislados caracterizados mediante perfiles de isoenzimas en este trabajo; con el propósito de verificar y corroborar la veracidad de las relaciones genéticas encontradas.
4. Evaluar la diversidad genética de los aislados estudiados con marcadores genéticos de ADN (RFLP, Microsatélites, AFLP).

BIBLIOGRAFIA

- AYALA, F. y ORSKOW, I. Evolution of fitness in populations of *Drosophila Serrata*. *Science* 150, 903 – 905.
- BELKHIR, K., 2004. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- BOWMAN, J.E., BRUBAKER, R.R., FRISCHER, H. and CARSON, P.E. Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 94, 544-551. (1967).
- CALDERON, F. y PAVLOVA, M. Metodologías para Análisis Químico de Suelos. Determinación del pH del suelo. 1999.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. y W. F. Bodmer. 1981. *Genética de las Poblaciones Humanas*. Ed. Omega, Barcelona.
- DE FARIA S.M., Lewis G.P., Sprent J.I., Sutherland J.M. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* 1989, 111: 607-612
- DELGADO, Lucia F. y GUEVARA, Claudia S. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Phaseoli* mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos. Universidad de Nariño. Programa de Química. 2003
- DELGADO, Lucia F. y GUEVARA, Claudia S. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Phaseoli* mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos. Universidad de Nariño. Programa de Química. 2003.
- DEMEZAS, DH. REARDON, TB. WATSON, JM. & GIBSON, AH. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, (1991) 57: 3489-3495.
- DEMEZAS, DH. REARDON, TB. WATSON, JM. & GIBSON, AH. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, (1991) 57: 3489-3495.

DOYLE J.J. & DOYLE J.L. Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. En: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Ecological Science. Berlin, Heidelberg. Vol. 39, (1997), p. 307

EARDLY, BD. MATERON, LA. SMITH, NH. JOHNSON, DA. RUMBAUGH, MD. & SELANDER, RK. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. Applied Environmental Microbiology. (1990), 56: 187-194.

ENGVILD y NIELSEN, 1985, Strain identification in *Rhizobium* by starch gel electrophoresis of isoenzymes. Plant and soil. 87: 251-256

FARFAN, Maribel. Estudio de la estructura genética de poblaciones de *Vibrio Cholerae*. Universidad de Barcelona. España, 2002. p 27.

FELSENTSTEIN, J., 1993. PHYLIP package, version 3.6. Seattle, WA: University of Washington (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)

GARCÍA P, Hilda Marilín. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. LABORATORIOS BETERÁ, UNIV DIAG (2000), p. 31

HARRISON, SP. JONES, DG. & YOUNG, JPW. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. J. Gen. Microbiology, (1989). 135: 1061-1069.

HARRISON, SP. JONES, DG. & YOUNG, JPW. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. J. Gen. Microbiology, (1989). 135: 1061-1069.

http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis_De_Suelos/MetodosQuimicosSuelos.htm#

HUBBY, J.L. Y LEWONTIN, R.C. A Molecular Approach to study of genic heterozygosity in natural populations. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 54, 577 – 994. (1966)

HUSSEIN, Zahran H. *Rhizobium* - Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climatic. Microbial. Mol. Biol. Rev. 63:968-989. (1999)

JARAMILLO, S. PATIÑO, L. F. LOPEZ, J. B. MARQUEZ, M. E. ZAPATA, J. L. MAZO, J. J. Complejidad de las poblaciones del hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, en el departamento de Antioquia. Revista Papa No. 17 (1997), p. 9-16

JOLY C., 1991. Biological nitrogen fixation within FAO agricultural production programmes in the context of sustainable development in Expert consultation on legume inoculant production and quality control, FAO, Rome.

LEVIN, B.R. periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *Escherichia Coli* populations, *genetics* 99, 1-23. (1981)

LEVOLLAY, J. L'azote et la vie; l'oeuvre de Jean Baptiste Boussingault. *Vies Scientifiques CR5*, 59-72. (1988)

LOWRY, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A. L. and Randall, U.L. "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

LUND, M.C.J., y col. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3140-3145. (1998).

MARTÍNEZ R. Esperanza y CABALLERO, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2:113-140.

MARTINEZ, O. Métodos estadísticos multivariados en Biología Molecular y su aplicación en investigación agrícola. *Agronomía Colombiana*. Vol. 12 No. 1 (1995), p. 66-71

MAYNARD SMITH, J. y col., 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90. 4384-4388.

McLELLAN, T. Molecular charge and electrophoretic mobility in cetacean myoglobins of known sequence. *Biochem. Genet.* 22, 181-200. (1984).

MILKMAN, R. and BRIDGES, M.M. Electrophoretic variation in *Escherichia Coli* from natural sources. *Science* 182, 1024-1026. (1973).

MOHD - SAUD, B. 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., 1990.

MUSSER, J.M. Molecular population genetic analysis of emerged bacteria: selected insights. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 1-17. (1996).

OCHMAN, R. y col. Enzyme polymorphism and genetic structure in *Escherichia Coli* and *Shigella*. *J. gen. Microbiol.* 129, 2715-2726. (1983)

OSORIO, B.J., 1989. Situación actual de la producción de arveja, haba, garbanzo y lenteja en Colombia. Ramakrishna (eds.), Quito, pp. 13-24.

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

RAMIREZ, M. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *trifolii*. II Perfiles de Isoenzimas. *Revista de suelos Ecuatoriales*. Vol. 25 (1995), p. 118 - 126

RIUS, N. Clonal population Structure of *Pseudomonas stutzeri*, a Species With Exceptional Genetic Diversity. *J. Bacteriol.* 183, 736 – 744. 2001

ROBINSON, K. Some observations on the taxonomy of the genus *Microbacterium*. Cell wall analysis gel electrophoresis and serology. *J. Appl. Bacteriol.* 29, 616-324. (1966)

ROLF, F.J., 1993. Numerical taxonomy and multivariate analysis (NTSYS), version 2.0. New York: Exeter Software.

SAENZ, CH. Hipertexto del área de la Biología “La pared Bacteriana”. Facultad de Agroindustria. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina 1998 – 2005. <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm#penicilina>

SASSER, M. and WICHMAN, M. D. (1991). Identification of microorganisms through use of gas chromatography. In: Hausler, W. J. Jr. , Herrmann, K. L.; Isenberg, H. D. and Shadony, H. D. (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 5th edn. American Society of Microbiology, Washington DC. pp. 111-118.

SELANDER, RK. Y otros. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Populations Genetics and sistematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 873 – 884. 1986

SEVILLANO, F. y RODRÍGUEZ, C. Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en Agricultura. En: *Avances en la biología de la Fijación de nitrógeno atmosférico*. Universidad de Sevilla. España. 1987, p. 9-29.

SILVESTER - BRADLEY, y otros. Simbiosis Leguminosa - *Rhizobium*, Evaluación, Selección y Manejo. Cali, CIAT. (1987), p 73.

SOMASEGARAN, P. HOBEN, H. 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.

STEAD, D. E.; SEILWOOD, J. E.; WILSON, J. AND VINEY, I. (1992). Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 315-321.

WILLIAMS, R.A. and BOWDEN, E. The starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glyceraldehuyde-3-phosphate dehydrogenase of *stretococcus faecalis*, s. *microbiol.* 50, 329-336

ANEXOS

Anexo A. Lista de los géneros y especies de rizobios aprobados hasta el año 1996 (adaptado de Young y Haukka, 1996)

Rhizobium (Frank, 1889)

Rhizobium leguminosarum (Frank, 1889)

Rhizobium tropici (Martínez-Romero et al, 1991)

Rhizobium etlii (Segovia, Young & Martínez-Romero, 1993)

Rhizobium (Agrobacterium) *rhizogenes* (Sawada et al, 1993)

Sinorhizobium (de Lajudie et al, 1994)

Sinorhizobium meliloti (Dangeard, 1926; de Lajudie et al, 1994)

Sinorhizobium fredii (Scholla & Elkan, 1984; de Lajudie et al, 1994)

Sinorhizobium saheli (de Lajudie et al, 1994)

Sinorhizobium teranga (de Lajudie et al, 1994)

Sinorhizobium medicae (Rome et al, 1996)

Mesorhizobium (Lindstrom et al, 1995)

[*Rhizobium*] *loti* (Jarvis, Pankhurst & Patel, 1982)

[*Rhizobium*] *huakii* (Chen et al, 1991)

[*Rhizobium*] *ciceri* (Nour et al, 1994)

[*Rhizobium*] *tianshanense* (Chen et al, 1995)

[*Rhizobium*] *mediterraneum* (Nour et al, 1995)

[*Rhizobium*] *galegae* (Lindstrom, 1989)

Bradyrhizobium (Jordan, 1982)

Bradyrhizobium japonicum (Kirchner, 1895; Jordan, 1982)

Bradyrhizobium elkanii (Kuykendall et al, 1992)

Bradyrhizobium liaoningense (Xu et al, 1995)

Bradyrhizobium sp. (Young, 1996)

Azorhizobium (Dreyfus et al, 1988)

Azorhizobium caulinodans (Dreyfus et al, 1988)

Photorhizobium (Eaglesham et al, 1990; Young et al, 1991) No aprobado hasta la fecha

Anexo B. Lista de géneros y especies propuestos en el período de 1997 hasta el 2001

Rhizobium giardinii (Amarger et al, 1997)

Rhizobium gallicum (Amarger et al, 1997)

Rhizobium hainanense (Chen et al, 1997)

Rhizobium huatlense (Wang et al, 1998)

Rhizobium mongolense (van Berkum et al, 1998)

Sinorhizobium arboris (Nick et al, 1999)

Sinorhizobium kostiense (Nick et al, 1999)
Mesorhizobium plurifarum (de Lajudie et al, 1998)
Mesorhizobium amorphae (Wang et al, 1999)
Allorhizobium undicola (de Lajudie et al, 1998)
Methylobacterium (Sy et al, 2001) Este género es completamente diferente a los pertenecientes a la familia Rhizobiaceae y comprende varias especies
Ralstonia taiwanensis (Chen et al, 2001) Esta especie forma nódulos en Mimosa.

Anexo C. Médios de cultivo.

✓ Caldo de Levadura Manitol (CLM)

Manitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Agua destilada	1 litro

Se ajusta el pH a 6.8. Se esteriliza en autoclave a 121 °C y 15 lb. durante 20 minutos.

✓ Levadura Manitol Agar (LMA)

Caldo de Levadura Manitol	1 litro
Agar	15 g

✓ Medio enriquecido Triptona Levadura (TY)

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂	1 g
Agua	1 litro.

Se adicionan en orden: Galactosa, glucosa, xilosa, myo-inositol, sorbitol, manitol y L-arabinosa a razón de 0.1g por cada Litro. (ENGVILD y NIELSEN, 1985, Strain identification in Rhizobium by starch gel electrophoresis of isoenzymes. Plant and soil. 87: 251-256)

Anexo D. Soluciones y tampones

✓ Soluciones para teñido Gram. (Vincent, 1970)

Solución I. Solución de cristal violeta

Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g

Etanol	100 ml
Agua destilada	400 ml

Solución II. Solución de yodo

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Etanol	25 ml
Agua destilada	100 ml

Solución III. Etanol al 95 %

Solución IV. Revelador

Safranina al 2.5% en etanol	10 ml
Agua destilada	100 ml

✓ Solución Ringer ¼

Esta solución isotónica se utiliza para realizar los lavados de las células en la preparación de las muestras. La solución se prepara disolviendo los siguientes reactivos:

NaCl	2.250g
KCl	0.105g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.120g
NaHCO ₃	0.050g
Agua Destilada csp.	1 L

Se ajusta el pH 7.2 y finalmente se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

✓ Tampón de Lisis Tris – EDTA - NADP (TE-NADP)

Esta solución tampón (10mM Tris – 1mM EDTA, pH 6.8) se utiliza para preparar los extractos proteicos de cada una de los aislados que se estudiarán.

Tris 0.5 M	2 mL
EDTA 0.5 M	0.2 mL
NADP	0.039 mg
Agua Destilada csp.	100 ml

La solución se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos si es necesario se ajusta el pH con una solución NaOH 0.1M, se guarda refrigerada a 4°C hasta su uso.

✓ Solución de Acrilamida / Bisacrilamida al 30%

Esta solución se empleara en la preparación de los geles de poliacrilamida.

Acrilamida	29.2 g
N-N'-metilen-bis-acrilamida	0.8 g
Agua Destilada csp.	100 ml

La solución se prepara utilizando guantes y mascarilla como protección debido a su efecto tóxico (neurotoxina). Se guarda protegida de la luz y a una temperatura de 4°C hasta su uso.

✓ Tampón Tris – HCl

Esta solución con diferente concentración y pH, se empleará en la elaboración de los geles de poliacrilamida, en la preparación de azul de bromofenol y como componente de diferentes tinciones enzimáticas específicas.

Uso y composición de Tampones TRIS – HCl de diferentes concentraciones y pH.

	TAMPONES	COMPOSICIÓN
Preparación de Geles	Tris / HCl 0.125M pH 6.8	15.1g Tris en 1L agua destilada
	Tris / HCl 0.4M pH 8.8	48.5g Tris en 1L agua destilada
	Tris / HCl 0.8M pH 8.8	96.9g Tris en 1L agua destilada
Azul de bromofenol	Tris / HCl 0.2M pH 8.8	24.2g Tris en 1L agua destilada
Tinciones específicas	Tris / HCl 0.02M pH 7.0	2.4g Tris en 1L agua destilada
	Tris / HCl 0.2M pH 8.8	24.2g Tris en 1L agua destilada
	Tris / HCl 0.5M pH 7.1	60.6g Tris en 1L agua destilada
	Tris / HCl 0.7M pH 8.5	91.5g Tris en 1L agua destilada

Todas estas soluciones se guardan a 4°C hasta su uso.

✓ Solución de Azul de Bromofenol

Esta solución se utilizará para preparar las muestras que van a ser sometidas a electroforesis en los geles de poliacrilamida. El glicerol, por su elevada densidad ayuda a que las muestras depositadas en los pozos de los geles verticales queden compactadas en la parte inferior, y el azul de bromofenol es un colorante que permite seguir el frente de las muestras durante todo el proceso de electroforesis y saber así cuando llegan al final del gel para detener la electroforesis.

Glicerol	8mL
Tris / HCl 0.2M pH 8.8	2mL
Azul de Bromofenol 0.05%	5mg

La solución se homogeniza y se mantiene a 4 °C protegida de la luz.

✓ Solución Tris – Glicina 0.19M

Esta solución se utiliza como tampón de electroforesis, el cual permite el contacto directo de los electrodos con los geles de poliacrilamida.

Tris-(hidroximetil)-Aminometano	3.0g
Glicina	14.4g
Agua destilada csp.	1L
pH final	8.3 – 8.7

✓ Tampón Fosfato pH 6.0 y 7.0

Estas soluciones tampón se utilizan para realizar algunas de las tinciones enzimáticas específicas.

Na ₂ HPO ₄ 0.2M	30.5mL
NaH ₂ PO ₄ 0.2M	19.5mL
Agua destilada csp.	100ml

Se ajusta el pH de las soluciones una a pH 6.0 y otra pH 7.0, finalmente los tampones se esterilizan en autoclave a 120°C durante 20 minutos y se refrigeran a 4°C hasta su uso.