

Caracterización de aislamientos de rizobios de suelos ácidos y alcalinos en la región semiárida de Pernambuco

M.L.R. BASTOS DA SILVA¹, H. ALMEIDA BURITY², M.V. BARRETO FIGUEIREDO³, N.S. AGUIAR DE FREITAS⁴, A.C.E.S. MERGULHÃO¹, M.C.C. PEREIRA DE LYRA⁴

¹Laboratório de Biologia de Solo, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Av. General San Martins 1371, Bonji, Recife, Pernambuco, 50761-000, ²EMBRAPA/ IPA, Laboratório de Biologia de Solo, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, ³EPEAL/IPA, Laboratório de Biologia de Solo, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, ⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Laboratório de Genética, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.
*Correspondencia. E-mail: luiza@ipa.br

RESUMEN

La variabilidad genética de cepas pertenecientes al género *Rhizobium* aisladas en suelos ácidos y alcalinos de la región semiárida de Pernambuco se evaluó utilizando 17 *primers* de secuencias arbitrarias. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1,4% y visualizados por coloración con bromuro de etídio en un transiluminador de luz ultravioleta. Los resultados indican la existencia de una alta variabilidad entre los aislamientos. La aplicación del método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic average*), basado en el coeficiente de Jaccard's analizado a través de dendrogramas, permitió clasificar las cepas aisladas en cuatro grupos. Las cepas provenientes de suelos ácidos se incluyeron dentro de uno de los grupos mientras que las provenientes de suelos alcalinos se ubicaron en los otros tres. Sin embargo, uno de los grupos formados por la cepa Isol-14, proveniente de suelos alcalinos, está más emparentada con el grupo de cepas provenientes de suelos ácidos que con el resto de los grupos provenientes de suelos alcalinos.

Palabras claves: *Rhizobium tropici*, UPGMA, similitud genética, pH

SUMMARY

Characterization of rhizobia isolates from acid and alkaline soils in the semiarid zone of Pernambuco. The genetic variety of the *Rhizobium* isolates from acid and alkaline soils in the semiarid zone of Pernambuco state was evaluated through the use of 17 primers of arbitrary sequence. Amplified products were separated by electrophoresis in agarose gel at 1.4 % and visualized by ethidium bromide coloration. The results obtained suggest a high genetic variety of the isolates in relation to the standard strain. Data were analyzed by UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic average*), based on Jaccard's coefficient and visualized through dendrograms. The strains isolated from the acid soils were included in one group whereas the strains from alkaline soils were located in other three groups. Meanwhile, one of the groups formed by strain Isol-14, isolated from acid soils is more related to the groups of strains isolated from acid soils than to the remaining groups from alkaline soils.

Key words: *Rhizobium tropici*, UPGMA, genetic similarities, pH

INTRODUCCIÓN

En rizobacterias simbióticas, como las pertenecientes al género *Rhizobium*, la evolución de la población puede ser influenciada por condiciones ambientales que sirven de barreras biológicas

para el cambio de genes. El aislamiento geográfico, el tipo de suelo, el genotipo de la planta hospedadora son importantes parámetros para el estudio de la evolución de un organismo (28). Por ejemplo, el pH del suelo moderadamente bajo puede afectar el establecimiento efectivo de la

simbiosis de rizobios inoculados y nativos (4). En suelo ácido se observa una pobre simbiosis que es resultado de varios factores como la población de rizobio existente, el tipo de la planta hospedadora y la interacción simbiótica entre el macro y microsimbionte (8).

La alta diversidad genética observada en los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* puede estar asociada con un fuerte desequilibrio o no de linaje, con lo cual evidencia los cambios genéticos en estas poblaciones (6, 13).

El análisis de la estructura genética de las poblaciones de rizobios tiene importancia práctica ya que sus resultados pueden ser utilizados para evaluar el destino de las cepas nativas y observar sus impactos en la comunidad microbiana residente (17, 24).

La irregularidad de respuesta del frijol a la inoculación con rizobios se ha atribuido, entre otros factores, a la baja capacidad competitiva, baja eficiencia en fijar N_2 y la inestabilidad genética del microsimbionte (15). Esta inestabilidad genética puede ser originada por la elevada frecuencia de reorganización genómica y/o deleción plasmídica después de la exposición a temperaturas elevadas, comprometiendo la utilización de estas cepas como inoculantes, especialmente en suelos tropicales (11, 20). Un elemento adicional que puede desempeñar un papel crítico en la evolución de las poblaciones de rizobios es la ocurrencia de grandes plásmidos que puedan tener una diferente historia evolutiva en relación a las cepas actuales (3).

En estudios recientes, el uso de técnicas moleculares ha estimulado el desarrollo de métodos simples y rápidos de caracterización de poblaciones microbianas naturales, que revelaron una gran variabilidad genética de las comunidades microbianas en el suelo nativo (21, 18). Esta amplia variabilidad fue investigada en la familia *Rhizobiaceae* observándose evidencias de cambios genéticos en sus poblaciones (25, 26).

Al analizar la variabilidad intra-nodular en distintos aislamientos de *Rhizobium* (28), usando como técnicas RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), PFGE (digestión de largos fragmentos genómicos usando electroforesis en campo pulsado) y perfiles de plásmidos, fue posible evaluar la frecuencia de infecciones nodulares múltiples. Las mismas pueden derivar de un único in-

vasor que sufrió alteraciones genéticas posiblemente durante la infección, como por ejemplo, pérdida de plásmidos.

Debido a su accesibilidad, la técnica de RAPD viene siendo ampliamente usada en estudios de diversidad, como también de certificación genética (27). El análisis de DNA por RAPD ocurre debido al apareamiento de un *primer* único en puntos próximos del genoma, delimitando la región que será amplificada (12). Los RAPDs son marcadores moleculares dominantes pues si uno de los alelos de un *locus* no pueda ser amplificado, sea por diferencias de tamaño o distintas composiciones en nucleótidos, no es posible distinguir el homocigota (marcador/marcador) del heterocigota (marcador/alelo nulo). El polimorfismo detectado por RAPD se refiere a las mutaciones que ocurren en fragmentos de DNA impidiendo la hibridación del *primer* a los intervalos del fragmento que permitan la amplificación del segmento por la polimerasa. El resultado es la ausencia de banda para un individuo homocigota. Otras causas del polimorfismo en RAPD son inserciones o deleciones de secuencias. Los marcadores RAPD tienen el inconveniente de ser de tipo dominante, es decir, no es posible discernir sobre la heterocigosis de los *loci* observados (19).

Uno de los programas de investigación conducido por la Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuaria (IPA), en el Laboratorio de Biología del Suelo, es estudiar la variabilidad genética de aislamientos de rizobios tolerantes a temperaturas elevadas colectados en suelos con pH ácido y alcalino. Las investigaciones preliminares seleccionaron 14 aislamientos de rizobios que presentaron un comportamiento superior a la media en la fijación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la variabilidad genética de los aislamientos de rizobios comparándolos con la cepa patrón de *Rhizobium tropici* CIAT899 por medio de marcadores moleculares RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

El medio TY líquido (1) fue usado como cultivo de rutina para el crecimiento de las bacterias y la extracción de DNA total (10). Como material biológico, los aislamientos fueron seleccionados en dos etapas. Se inoculó las semillas de *P. vulgaris* cv. Princesa con diluciones del suelo oriundas de

Cuadro 1. Oligonucleótidos de 10 bases (*primers*), sus secuencias de bases y número de bandas polimórficas y monomórficas.

Oligonucleótidos (<i>primers</i>)	Secuencias		Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
	5'	3'		
OPA-09	TGCTACGATT		9	2
OPD-03	GTCGCCGTCA		10	4
OPD-13	GGGGTGACGA		11	4
OPD-20	ACCCGGTCAC		6	4
OPE-02	GGTGCGGGAA		4	2
OPF-04	GGTGATCAGG		9	6
OPF-06	GGGAATTCGA		10	0
OPF-10	GGAAGCTTGG		11	6
OPN-04	GACCGACCCA		12	0
OPN-13	AGCGTCACTC		7	4
OPP-02	TCGGCACGCA		0	6
OPP-06	GTGGGCTGAC		8	1
OPP-09	GTGGTCCGCA		7	2
OPAA-14	AATTGCCATC		6	4
OPAA-18	TGGTCCAGCC		4	0
OPAC-19	AGTCCGCCTG		11	2
OPAD-01	CAAAGGGCGG		6	1
Total			114	48

la región semiárida del Estado de Pernambuco donde las temperaturas son elevadas y el suelo presenta diferencias en el pH. Los aislamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 fueron de suelos con pH alcalino y los aislamientos 11, 13, 14, 15, 16 y 17, de suelo de pH ácido. Las semillas fueron esterilizadas usando alcohol 95% durante 2 min, hipoclorito de sodio 1% durante 7 min y 10 lavados con agua estéril. Las semillas fueron germinadas en papel de germinación. Las plántulas fueron transferidas a tubos con 5 ml de solución nutritiva sin nitrógeno (9, 22). El ensayo se hizo en cámara de crecimiento con 12 h de luz a 32 °C y 12 h de oscuridad a 28 °C. Después de 30 días, se procedió a la medición de la fijación de nitrógeno por el método cualitativo del ARA (actividad de reducción de acetileno) y los nódulos fueron esterilizados para proceder al aislamiento. Los aislamientos escogidos para la etapa siguiente en invernadero fueron los que presentaron una media superior o igual a la actividad de la nitrogenasa obtenida por la cepa patrón CIAT899. En el segundo ensayo se utilizó como sustrato el mismo suelo empleado al comenzar la selección. Cada jarro tenía la capacidad para 5 kg de suelo. El delineamiento estadístico usado fue de bloques

al azar con tres réplicas. La inoculación fue hecha usando el medio YMA líquido, midiendo la densidad óptica a 540 nm y un número de células de aproximadamente 109 cfu.ml⁻¹. La temperatura media en todo el experimento fue 32 °C durante 35 días. A partir de los resultados obtenidos con el ARA, se seleccionaron los aislamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, y 17 para los análisis de RAPD.

Los análisis de RAPD fueron realizados utilizando los *primers* descritos en el Cuadro 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: el volumen de reacción fue de 13 µl conteniendo 1,3 µl de tampón 10X; 200 mM de cada uno de los deoxinucleótidos; 15 ng de *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA USA); 5 ng de DNA genómico; 1,5 U de Taq-polimerasa. Las amplificaciones fueron efectuadas en termociclador (MJ Resarch Thermocycler), programado con 36 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 36 °C, y 2 min a 72 °C, utilizando una extensión final de 72 °C por 10 min y mantenidos a 20 °C hasta retirar el material del termociclador. Los productos de amplificación fueron analizados en gel de agarosa a 1,4% en tampón 1X TAE (TRIS-Acetato-EDTA). La separación electroforética fue

de aproximadamente 4 h, a 85 V. Al término de la corrida, los geles fueron inmersos en solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) por 30 min, visualizados en luz ultravioleta y fotografiados en película polaroid 667.

Para el análisis filogenético, los patrones de bandas generados por el análisis de RAPD fueron comparados para determinar la distancia genética entre los aislamientos y la cepa patrón de *R. tropici* CIAT899 oriunda del Instituto de Pesquisas Agronómicas (IPAGRO, Rio Grande do Sul, Brasil). La interpretación de los datos fue hecha de la siguiente manera: las bandas de DNA comunes entre los aislamientos fueron consideradas de similitud genética, mientras que bandas no comunes fueron consideradas diferencias genéticas (7).

Los datos obtenidos fueron utilizados para la generación de una matriz construida de acuerdo con la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda en los diferentes aislamientos. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, versión 1.70, Exeter software, NY, USA) (16). Las distancias genéticas fueron calculadas por el coeficiente de "Jaccard's", el dendrograma fue construido en el mismo programa usando la opción UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average*).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los datos de los RAPDs de los 14 aislamientos de *Rhizobium* spp., con los 17 *primers*, que variaban en el contenido de G+C de 40 a 80%. Al analizar el dendrograma podemos decir que estos aislamientos se dividen en dos grupos. El grupo I que comprende los aislamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 provenientes de suelo alcalino y el grupo II con los aislamientos

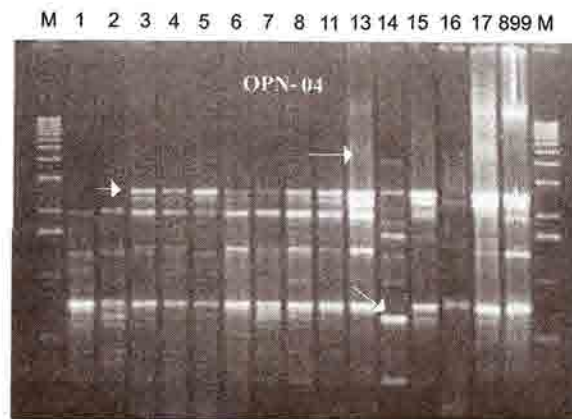


Figura 1. Patrones de RAPD, obtenidos después de la amplificación y separación de los productos por electroforesis, entre los aislamientos y la cepa patrón de *Rhizobium tropici* CIAT899 con el cebador OPN-04. (M) Marcador 123 pb DNA Ladder

Isol-1	1.000
Isol-2	0.825 1.000
Isol-3	0.608 0.621 1.000
Isol-4	0.703 0.641 0.738 1.000
Isol-5	0.621 0.603 0.771 0.678 1.000
Isol-6	0.636 0.627 0.714 0.813 0.683 1.000
Isol-7	0.626 0.580 0.650 0.764 0.640 0.724 1.000
Isol-8	0.691 0.655 0.728 0.826 0.688 0.719 0.833 1.000
Isol-11	0.642 0.622 0.783 0.766 0.683 0.713 0.716 0.797 1.000
Isol-13	0.669 0.644 0.692 0.764 0.636 0.683 0.675 0.766 0.825 1.000
Isol-14	0.500 0.419 0.387 0.438 0.368 0.388 0.436 0.496 0.420 0.441 1.000
Isol-15	0.653 0.617 0.703 0.676 0.693 0.627 0.664 0.709 0.731 0.700 0.452 1.000
Isol-16	0.660 0.613 0.725 0.691 0.680 0.645 0.635 0.727 0.810 0.792 0.452 0.806 1.000
Isol-17	0.664 0.634 0.723 0.694 0.686 0.659 0.707 0.768 0.765 0.793 0.455 0.746 0.848 1.000
Ciat-899	0.595 0.574 0.681 0.688 0.610 0.606 0.658 0.756 0.723 0.720 0.378 0.661 0.733 0.767 1.000

Figura 2. Matriz de similitud genética de los aislamientos de rizobios y cepa patrón de *R. tropici* CIAT899 basado en el coeficiente de Jaccard's

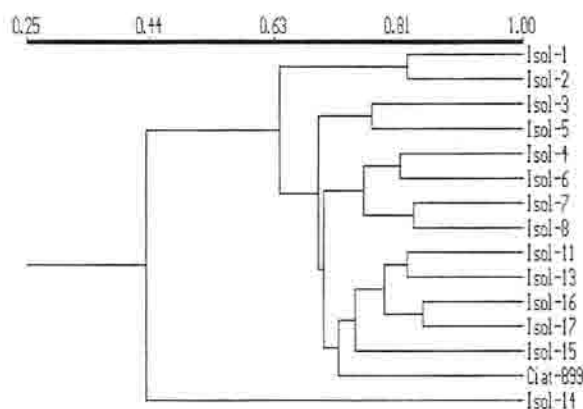


Figura 3. Dendrograma de similitud genética de RAPD de los aislamientos de rizobios con la cepa patrón de *R. tropici* CIAT899.

oriundos de suelo ácido 11, 13, 15, 16, 17 y la cepa patrón CIAT899. El aislamiento 14 fue el que presentó la mayor diferencia con relación a los demás aislamientos, no agrupándose en ninguno de los dos grupos. A pesar de haber sido aislado en suelo alcalino se ha agrupado, aunque con una baja similitud genética, con los aislamientos del grupo I. La Figura 1 muestra un patrón de amplificación obtenido con el *primer* OPN-04, donde los *fingerprint* generados produjeron 12 bandas utilizadas en el análisis de similitud, siendo todas ellas polimórficas. Con este *primer*, se evidencia la diferencia en el patrón de bandas del aislamiento 14. En la matriz de similitud genética (Figura 2), los aislamientos muestran una distancia media de 0,368 (36,8%). La mayor distancia genética entre los aislamientos fue observada entre los Isol-14 y Isol-15. El Isol-14 presentó el menor índice de similitud, una distancia media de 0,378 (37,8%) con relación a la cepa patrón CIAT-899, lo que permitió la fácil distinción entre este aislamiento y los demás.

La mayor similitud encontrada con la cepa CIAT899 fue con el Isol-17 con un 76,7%. Con relación a los aislamientos entre sí, la distancia genética más alta fue de un 84,8% observada entre el Isol-17 y el Isol-16.

El análisis de RAPD (Figura 3) demostró la existencia de polimorfismo genético entre los aislamientos de rizobios y la cepa patrón de *R. Tropici*, comprobando que esta técnica es útil para la identificación de poblaciones nativas de rizobios.

DISCUSIÓN

En este trabajo se han caracterizado 14 aislamientos de rizobios provenientes de suelos con pH alcalino y ácido. El uso de *primers* cortos de secuencias aleatorias, como los utilizados en RAPD, permite que éstos se unan por complementariedad a los fragmentos de DNA molde promoviendo la síntesis del DNA copia. Por presentar secuencias aleatorias y debido a las temperaturas de hibridación muy bajas, se logró la síntesis de varios segmentos de DNA de tamaños distintos produciendo un perfil de RAPD de menor o mayor reproducibilidad característico de cada organismo.

La diversidad de los aislamientos estudiados en este trabajo nos permite decir que esta técnica es adecuada para identificación de individuos en diferentes poblaciones. Estudios anteriores se basaron en la teoría de que cualquier secuencia de oligonucleótidos escogida al azar, se distribuiría en forma variable dentro del genoma en los diferentes individuos (2).

Al utilizar los 17 *primers* observamos patrones distintos entre los aislamientos y la cepa patrón y estableciendo correlación con las características del suelo, particularmente el pH, donde fueron colectados. Resultados semejantes fueron obtenidos por Pinto y col (14) trabajando con cepas nativas del Cerrado. Paffetti y col (13) observaron que las diferencias físicas y químicas de suelos pueden influenciar, aunque parcialmente, en las diferencias genéticas entre las cepas. Strain y col (23) también demostraron que el pH del suelo es un factor crítico en el establecimiento de diferencias genéticas entre poblaciones de *R. leguminosarum*.

El análisis de similitud genética de los datos generó 162 bandas con una media de 9,5 bandas por *primer*, y solamente 48 bandas estaban presentes en todos los aislamientos, no pudiendo ser usadas para diferenciarlos (2,9 bandas monomórficas/*primer*), siendo las otras 114 (6,7 bandas/*primer*) bandas polimórficas que permitieron el agrupamiento en dos grupos. Sin embargo, de las 114 bandas polimórficas, el aislamiento 14 generó 21 de ellas, demostrando que este individuo presenta un patrón que lo distingue de los demás, probablemente proviene de otra especie de rizobio.

En este trabajo se muestra que la elección de los *primers* puede influir sobre la cantidad de informaciones genéticas obtenidas. Los productos de amplificación de los 17 *primers* aleatorios usados en este trabajo indicaron una fuerte relación entre los aislamientos. El RAPD es una técnica que puede dar informaciones sobre la diversidad genética y el grado de relación en el ámbito molecular, así como generar datos sobre la relación genética entre los aislamientos en concordancia con los obtenidos por análisis morfológicos, químicos y moleculares, como isoenzimas y RFLP (5, 8).

Rhizobium tropici, cepa CIAT899 posee la habilidad de crecer en suelo ácido y por lo tanto, es lógico que esté agrupado con los aislamientos del grupo II. Así podemos concluir que los *primers* seleccionados en este estudio fueron capaces de caracterizar los aislamientos provenientes de suelo con pH diferente y por lo tanto adecuado al objetivo propuesto por este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al apoyo financiero de la Fundação da Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), a la Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) y la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

BIBLIOGRAFÍA

- Beringer J E (1974) R-Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198.
- Caetano - Anollés G B, Bassam J, Gresshoff, P M (1991) DNA amplification *fingerprint* using very short arbitrary oligonucleotide primer. Biotechnology 9: 553-557.
- Corich V, Giacomini A, Carlot M., Simon R, Tichy H V, Squartini A, Nuti M P (2001) Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. Can. J. Microbiol. 47: 580-584.
- del Papa M F, Balagué L J, Sowinski S C, Wegener C, Segundo E, Abarca F M, *et al* (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1420-1432.
- Demeke T, Adams R P (1994) The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. In: Griffin, H. Griffin, A M (Ed), PCR technology - CURRENT innovations. Florida: CRC Press, p. 179-191.
- Demezas D H, Reardon T B, Watson J M, Gibson H (1991) Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3489-3495.
- Ferreira M E, Grattapaglia D (1995) Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genéticas. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, p. 220.
- Harrison S P, Mytton L R, Skot L, Dye M, Cresswell A (1992) Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. Can. J. Microbiol. 38: 1009-1015.
- Hungria M, Araújo R S (1994) Manual de Métodos empregados em estudos de Microbiologia agrícola. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF. p. 542.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York, USA.
- Martinez E, Romero D, Palacios R (1990). The *Rizobium* genome. CRC Crit. Rev. Plant. Science 9: 59-93.
- Narváez C R, Valenzuela J B, Muñoz C S, Hinrichsen P R. (2000) Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anóxicos. Agricultura Técnica del Chile. 60: 320-340.
- Paffetti D, Scotti C, Gnocchi S, Fancelli S, Bazzicaluppo M (1996) Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2279-2285.
- Pinto P P, Carvalho J G, Passos R V M, Vargas M A T, Purcino H, Sá N M (1999) Caracterização genética, via RAPD, de cepas nativas de rizobios associadas a *Arachis pintoi* isoladas dos Cerrados. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumos p. 291, Salvador, Bahia.
- Raposeiras R, Pinto P P, Scotti M R M L, Paiva E, Sá N M H (1997) Efeito da temperatura sobre a estabilidade de cepas de *Rhizobium* efetivas para a nodulação do feijoeiro. XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. CD-Rom.
- Rohlf F J (1992) NTSYS - pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system New York: State University of New York.
- Ronson C, Bosworth A, Genova M (1990) field release of genetically engineered *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains. IN: Gresshoff P, Roth E, Stacey G, Newton W (Ed), Nitrogen fixation: achievement and objectives. Chapman and Hall, New York. p. 397-403.
- Rooney-Vargas J M, Devereux R, Evans R S, Hines M E (1997) Seasonal change in the relative abundance of uncultivated sulfate-reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3895-3901.
- Russell J R, Hosein F, Johnson E, Waugh R, Powell W (1993) Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. Molec. Ecol. 2: 89-97.
- Selbitschka W, Lotz W (1991) Instability of cryptic plasmid affect the symbiotic effectivity of *Rhizobium*

- leguminosarum* bv. *viciae* strain. Molec. Microbiol. Interac. 4: 608-618.
21. Shofield P R, Gibson A H, Dudman W F, Watson J M (1987) Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in soil population. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2942-2947.
 22. Somasegaran P, Hoben H J (1985) Methods in legume-*Rhizobium* technology. In: Niftal (Ed), University of Hawaii, Paia, Hawaii, p. 46-47.
 23. Strain S R, Leung K, Whittam T S, de Bruijn F J, Bottomley P J (1994) Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and *viciae* populations found in Oregon soils under different plant communities. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2772-2778.
 24. Tiedje J M, Colwell R I, Grossman Y L, Hodson R E, Leunski R E, Mack R N, Regal P J (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological consideration and recommendations. Ecology 70: 298-315.
 25. Vinuesa P, Rademaker J L M, de Bruijn F J, Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulations endemic woody legumes of the canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism, analysis of genes encoding 16 SrRNA (16SrDNA) and 23SrDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprint, and partial 16SrDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2096-2104.
 26. Whittam S T (1992) Sex in the soil. Curr. Biol. 2: 676-678.
 27. Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tnigey S V (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
 28. Young J P W, Wexler M (1988) Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 134: 2731-2739.

Recibido: 5/6/02 – Revisado: 7/8/02