



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO
CENTRO DE ECOLOGIA

GENÉTICA Y ECOLOGIA DE POBLACIONES EN
Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli ASOCIADO A
Phaseolus vulgaris Y A P. coccineus SILVESTRE Y
CULTIVADO, EN MORELOS, MEXICO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN ECOLOGIA

P R E S E N T A :

VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA
DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR

MEXICO, D. F.

JUNIO, 1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado
Centro de Ecología

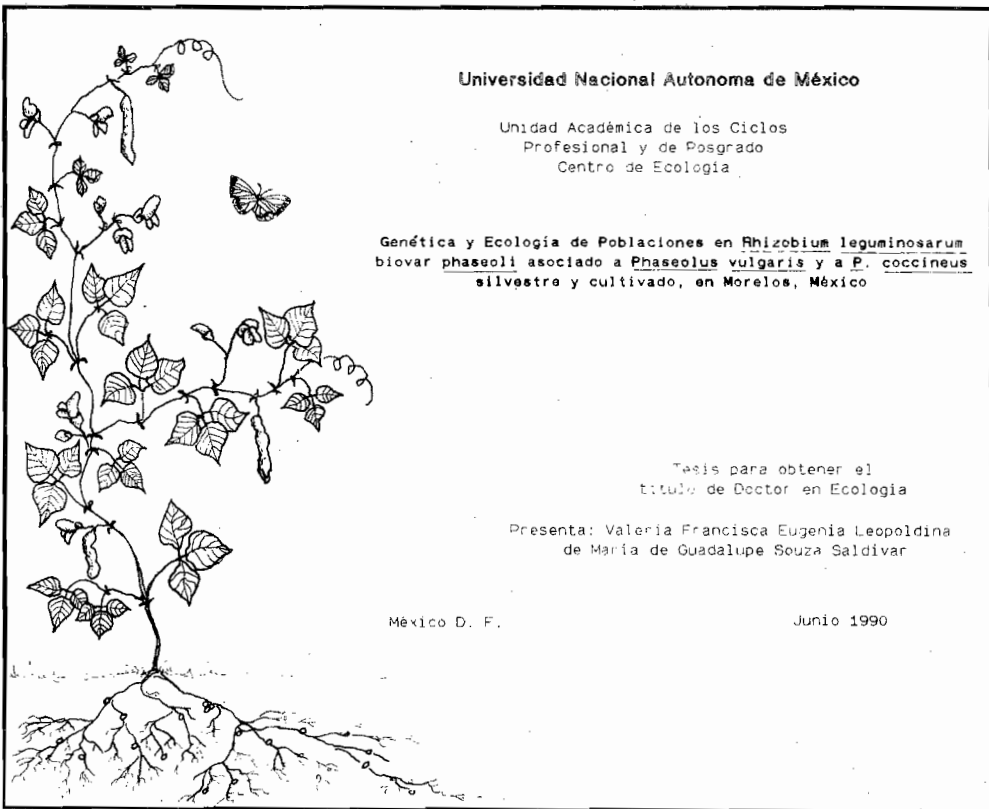
Genética y Ecología de Poblaciones en Rhizobium leguminosarum
biovar phaseoli asociado a Phaseolus vulgaris y a P. coccineus
silvestre y cultivado, en Morelos, México

Tesis para obtener el
título de Doctor en Ecología

Presenta: Valeria Francisca Eugenia Leopoldina
de María de Guadalupe Souza Saldívar

México D. F.

Junio 1990



A Luis y a Felipe
mis dos grandes amores

INDICE

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 1 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | |
| I.-Fijación de nitrógeno | 4 |
| II.-El suelo | 5 |
| III.-Microorganismos | 7 |
| IV.- <u>Phaseolus vulgaris</u> y <u>P. coccineus</u> | 12 |
| V.- <u>Rhizobium</u> | 13 |
| Objetivos | 21 |
| Material y Método | |
| I.-Descripción de sitios de estudio | 22 |
| II.-Colecta y manejo de cepas de <u>Rhizobium</u> | 27 |
| III.-Electroforesis | 29 |
| IV.-Análisis de suelos | 30 |
| V.-Análisis de datos | 31 |
| Resultados | |
| I.-Ecología | 35 |
| II.-Genética de poblaciones | 49 |
| Discusión | |
| I.-Ecología | 59 |
| II.-Genética de poblaciones | 62 |
| Conclusiones | 72 |
| Bibliografía | 74 |
| Anexo 1 | 85 |

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quisiera agradecer a mi esposo Luis Eguiarte por la ayuda prestada durante todo el desarrollo de esta tesis, por sus consejos, ideas e interesantes discusiones. Le agradezco también de todo corazón su apoyo, amor y comprensión en los momentos difíciles, así como los interminables fines de semana que me ayudó a cuidar a Felipe para que yo pudiera trabajar. Sin lugar a dudas, sin Luis esta tesis no se hubiera podido realizar.

Le agradezco a mi director de tesis, Dr. Daniel Piñero por haberme enseñado Genética de Poblaciones, así como a ser cuidadosa y paciente, también le agradezco su apoyo académico y logístico durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rafael Palacios y a la Dra. Esperanza Martínez les agradezco sus interesantes discusiones, la ayuda logística indispensable en la parte experimental de este trabajo, y sobre todo el haberme introducido al maravilloso mundo de Rhizobium.

A los demás miembros del jurado: Dr. Alfonso Delgado, Dr. Jorge Soberón, Dr. Exequiel Escurra, Dr. Victor Jaramillo y al Dr. Manuel Maass, les agradezco sus ideas, sugerencias y ayuda en el desarrollo y análisis de este trabajo.

El Dr. Jorge Soberón, Coordinador del Doctorado de Ecología y Elena Delgado merecen un agradecimiento especial porque resolvieron todo tipo de problemas y dudas académicas y administrativas, gracias sobre todo por su amistad.

Les agradezco a quienes empezaron siendo mis alumnos y acabaron siendo mis amigos: Germán Avila, Claudia Gallardo, Renato Capello y Javier Montoya. Sin ellos el trabajo de campo hubiera sido imposible, ellos también me dieron ánimos para estudiar a los rizobios asociados a Phaseolus coccineus, ellos fueron los que ayudaron a coleccionar estas bacterias, las aislaron, y purificaron, así como colaboraron en la realización de algunas electroforesis. Por todo esto y por todo lo demás, gracias. También les agradezco a Santiago Martínez y a Guillermo Iglesias quienes realizaron su servicio social en la parte inicial de la tesis.

Les agradezco a Lorenzo, Marta, Jaime, Marco, Miguel Angel, Irene, Alejandro, David, Maggie, Susi, Memo, Jose Luis, Carmen, Federico y Alejandra, su amistad, consejos, discusiones y ayuda durante mis estancias en CEIFINI. A Guadalupe Espín le agradezco el préstamo de su sonicador.

A Bob y Nina les agradezco su interés en este trabajo, su cariño sus invitaciones a su casa en Tepoztlán, y muy especial-

mente el prestamo de las parcelas de frijol cultivado en Santiago Tepetlapa. Sin su ayuda la realización de esta tesis hubiera sido muy difícil.

A Enrique Solis, quien realizó los análisis químicos de los suelos, mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. José Sarukhán, gracias por confiar en mi y ayudarme a extender el periodo de mi beca.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo, quien me enseñó que las mujeres también podemos hacer ciencia. Gracias.

A Gaby y a "la morsa" por prestarme "su" computadora, por su sentido del humor y por enseñarme a usar varios programas.

Gracias a Carlos Cordero quien leyó la tesis completa y me hizo correcciones muy valiosas. No le agradezco los discos que le presta a Luis.

Gracias a Nidia Pérez por su ayuda en el laboratorio.

A los cuates: Cesar, Juan, Cordero, Pola, Ana Maria, Lalo, Luz Maria, Alvaro, Jorge, y a todos los miembros del Centro de Ecología. Les agradezco su amistad, porras y ayuda en los momentos difíciles.

A mis amigas: Sioban, Pati, Dagmar, Lilian, Lupe, Cecilia, Rosy y Lena Paula por ayudarme con Felipe y sobre todo, por su amistad.

A mi Mamá y a Alex, mil gracias por todo....

A mi tía Pilar, gracias por invitarnos unas vacaciones cuando las necesitábamos más. También le agradezco a mis hermanos, tíos y primos su convicción de que estoy haciendo algo interesante.

A la familia de Luis, quienes me han adoptado como hija, les agradezco especialmente el cuidarnos a Felipe, Luis y a mi en la largísima hepatitis.

Esta tesis fué realizada en el Centro de Ecología. Agradezco el apoyo económico brindado por CONACyT por medio de subsidios otorgados a Daniel Piñero y por las becas de posgrado otorgadas por CONACyT (1985-1987) y DGAPA (1987-1989).

A Felipe, mi hijo de 2 años. Gracias por estar aquí.

RESUMEN

En este trabajo se estudió la ecología y la genética de poblaciones de la bacteria fijadora de nitrógeno Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado tanto a Phaseolus vulgaris L. (frijol común), como a P.coccineus L. (frijol ayocote), ambos silvestres y cultivados, en 5 sitios del Estado de Morelos. En el caso de las poblaciones asociadas a P.vulgaris estas fueron analizadas durante dos años (1987 y 1988), mientras que las tres poblaciones asociadas a P. coccineus solo fueron estudiadas durante 1988. En los sitios de P.vulgaris se tomaron muestras de suelo para cada planta muestreada para analizar posteriormente sus características fisicoquímicas, asimismo, se registraron diversos parámetros de las plantas. A todas las cepas aisladas se les analizó por medio de electroforesis en gel de almidón. Por medio del análisis de los electrotipos de cada año y de cada sitio se pudo determinar las abundancias, distribuciones espaciales, diversidad ecológica y dominancia de cada sitio de Rhizobium. También se pudo conocer como esta jerarquizada la diversidad genética, las relaciones de parentesco entre las cepas y la diferenciación entre subpoblaciones. Los resultados mostraron que los dos sitios donde se encuentra P.vulgaris difieren significativamente en cuanto a las concentraciones de nutrientes. En el sitio cultivado de P.vulgaris, algunas de las cepas más abundantes de 1987 fueron observadas nuevamente en 1988, mientras que en el sitio silvestre de P.vulgaris no se encontró ninguna cepa común a los dos años de estudio. Se analizó la distribución espacial de las cepas, tanto a nivel poblacional, como dentro de la raíz de una planta. Asimismo se observó que la población asociada a P.vulgaris cultivado presenta una mayor diversidad ecológica y una menor dominancia que la población asociada a P.vulgaris silvestre, mientras que en las poblaciones asociadas a P.coccineus ocurre lo contrario. Por otra parte, la diversidad genética se encuentra fuertemente jerarquizada en esta bacteria en todos los sitios estudiados. Se encontró que el sitio más diverso es el asociado a P.vulgaris cultivado y el menos diverso es el asociado a P.coccineus cultivado, las poblaciones asociadas a frijol silvestre presentan diversidades intermedias. En el análisis de los dendrogramas destaca el hecho de que las cepas asociadas a P.coccineus silvestre son muy diferentes a las asociadas a P.vulgaris silvestre, aún cuando estas se encuentran en un mismo sitio, también se observa que las cepas capaces de nodular en el frijol común cultivado forman un grupo muy heterogéneo. Las cepas asociadas tanto a frijol ayocote como a frijol común presentan una diferenciación entre subpoblaciones (Gst) muy marcada entre las poblaciones silvestres y las cultivadas.

INTRODUCCION

En esta introducción se hablará de aspectos generales de la fijación del nitrógeno y características del suelo y de la rizósfera para conocer la importancia de esta bacteria fijadora de nitrógeno así como para comprender mejor el ambiente que la rodea. Después se efectúa una recopilación bibliográfica sobre la ecología y la genética de poblaciones bacterianas con la finalidad de colocar al estudio de Rhizobium dentro de un marco general de información. Posteriormente se mencionará a los miembros de la interacción rizobio-leguminosa que ocupa este estudio, estos son los frijoles común (Phaseolus vulgaris L.) y ayocote (P. coccineus) así como la bacteria Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli.

I.- FIJACION DE NITROGENO

A) CICLO DEL NITROGENO

El nitrógeno constituye uno de los recursos más importantes para los seres vivos ya que forma parte de más del 16% de proteínas, enzimas y ácidos nucleicos (Jenny, 1980). Sin embargo, a pesar de que este elemento en su forma molecular (N_2), es el más abundante de la atmósfera pocos organismos pueden utilizarlo directamente en esta forma; por lo que requiere ser fijado por ciertos microorganismos para poder ser incorporado por los demás seres vivos (Jenny, 1980). Un ejemplo de la importancia de este elemento en los ecosistemas se encuentra en los suelos volcánicos jóvenes de Hawaii, donde la presencia de una sola especie (Myrica faya) que puede fijar nitrógeno, es capaz de cambiar la estructura de este ecosistema pobre en nitrógeno; Myrica puede incrementar cuatro veces la cantidad de nitrógeno disponible, esto tiene como consecuencia directa que el suelo se vuelve más fértil permitiendo así el crecimiento de numerosas especies (Vitousek et al., 1987).

El nitrógeno presenta un ciclo que se describe brevemente a continuación: El nitrógeno que incorporan los organismos a sus tejidos, en algún momento regresa a la forma inorgánica a través de una compleja serie de procesos que involucran su oxidación a amonio (NH_4^+) y nitratos (NO_3^-). El amonio normalmente es absorbido en el suelo, y de ahí puede ser retomado por las plantas y microbios o ser oxidado por las bacterias nitrificantes dando lugar al ión nitrato. El nitrato que no se lixivia es asimilado por los organismos o regresa a la atmósfera así en forma gaseosa a la atmósfera. Sin embargo el nitrógeno molecular es muy estable por lo que en condiciones normales no puede transformarse a formas más asimilables como son el amonio y los nitratos. Se requiere de la fijación de nitrógeno para que éste pueda ser utilizado; este proceso lo realizan bacterias fijadoras tanto de

vida libre como simbióticas (Richards, 1987).

II.-EL SUELO

El medio ambiente donde se desarrolla la bacteria fijadora de nitrógeno Rhizobium, es el suelo que rodea a las raíces de las leguminosas. Para poder comprender mejor como se comportan las poblaciones naturales de Rhizobium, a continuación se describe brevemente a los componentes biótico y abiótico del hábitat de esta bacteria.

A) Los organismos del suelo

Los organismos del suelo se clasifican en base a su tamaño en microbiota (algas, protozoarios, hongos, y bacterias), la mesobiota (nematodos, artrópodos y larvas pequeñas,) y la macrobiota (lombrices, moluscos, y artrópodos grandes). En este trabajo sólo se hablara de la microbiota.

La microbiota es importante para la fertilidad del suelo, ya que se considera que un buen suelo agrícola debe de contener al menos 2 mil millones de bacterias viables por gramo de suelo (Jenny, 1980).

Una de las características más notables del suelo es la distribución heterogénea de nutrientes (Richards, 1987). Elementos como el nitrógeno y el azufre, que se presentan principalmente en la materia orgánica, son más abundantes en la superficie del suelo y van disminuyendo en los horizontes más profundos. Un patrón similar presenta el fósforo, potasio y el calcio intercambiable (Miller, 1988). Algunos organismos requieren ciertos compuestos orgánicos además de los nutrientes esenciales; estos nutrientes se denominan factores de crecimiento e incluyen aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, siendo estos muy abundantes en la rizósfera de las plantas (Jenny, 1980).

La presencia de sustrato es el factor limitante más importante para la microfauna heterótrofa, este sustrato es heterogéneo tanto en el tiempo como en el espacio. Por lo que los microorganismos del suelo tienen que presentar mecanismos para llegar a sustratos nuevos una vez de que los anteriores se acabaron (Miller, 1988). Esto sugiere que la dispersión es el factor clave para la continuidad de la microfauna. Los microbios del suelo tienen que moverse a los sustratos adecuados o los sustratos recientes llegan en ocasiones a los sitios viejos ya sea por caída de hojas, de madera, degradación de las raíces, muerte o defecación de animales. La dispersión en el espacio esta ligada a la reproducción, mientras que la dispersión en el tiempo esta relacionada con estructuras de sobrevivencia como esporas o latencia; en el caso de las bacterias estas se encuentran en el suelo formando colonias que sobreviven cubriéndose de mucílago y embebidas en materiales húmicos (Richards, 1987).

B) La rizósfera, sitio donde se desarrolla Rhizobium

La región que se encuentra en la vecindad inmediata de las raíces de las plantas se denomina rizósfera, en ella el suelo es extremadamente favorable para los microorganismos ya que es rico en carbohidratos, metabolitos secundarios y otros nutrientes; la microfauna y flora que habita en esta región del suelo es distinta de la del resto del suelo. Dentro de la rizósfera las interacciones entre microorganismos y las plantas pueden afectar considerablemente la productividad de la planta, la fertilidad del suelo, la existencia de otras plantas y el flujo de nutrientes (Richards, 1987). La rizósfera es el sitio de descomposición orgánica en muchos ecosistemas, asimismo, la rizósfera genera cierta heterogeneidad de habitat ya que contiene más nutrientes para los microorganismos que el resto suelo por lo que contribuye de manera importante a la riqueza de especies de la comunidad subterránea (Stanton, 1988).

El concepto de rizósfera fue acuñado en 1904 por Hiltner (en Richards, 1987), siendo los límites de ésta variables y poco definidos. Las raíces están rodeadas de una capa mucilaginosa que varía su composición desde polisacáridos relativamente simples hasta polímeros complejos. La influencia de esta zona mucilaginosa (la cual mide entre 10 y 20 μm de ancho) en el suelo cercano depende de las características de éste, siendo de varios milímetros en los suelos arenosos (Papavizas y Davey, 1961 en: Richards, 1987). Existen evidencias de una zonación de la rizósfera (Tabla 1), encontrándose que estas contienen diferentes densidades de bacterias.

TABLA 1

NUMERO DE ORGANISMOS EN LAS DIVERSAS ZONAS DE LA RIZOSFERA DE Trifolium repens (Foster y Rovira, 1978 en: Alexander, 1984)

| Zona | distancia de la raíz μm | número de tipos microbianos | frecuencia en suelo ($\text{Cel}/\text{cm}^3 \times 10^9$) |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|
| Rizoplano | 0-1 | 11 | 120 |
| Rizósfera interna | 0-5 5-10 | 12 5 | 96 41 |
| Rizósfera externa | 10-15 15-20 | 2 2 | 34 13 |

La densidad microbiana en la rizósfera reportada para Es-

tados Unidos de Norteamérica es de cerca de 50 billones de microorganismos por cm^3 , lo cual representa varios ordenes de magnitud más que el resto del suelo (Richards, 1987).

Se considera que la estimulación de los microorganismos cercanos a la raíz es producida por sustancias que provienen de la planta, éstas se clasifican en exudados, secreciones y mucilago (Richards, 1987). Las altas densidades de microorganismos en la rizósfera producen un mayor grado de competencia entre los microbios y de presiones de selección que favorecen a aquellos organismos capaces de crecer rápido y de ser versátiles bioquímicamente, esto sugiere que la microflora de la rizósfera tiene una mayor habilidad para resistir cambios bioquímicos rápidos que el resto de los organismos del suelo (Bowen, 1980, en Richards, 1987).

III.-Microorganismos

Con la finalidad de situar este estudio sobre la genética de poblaciones y la ecología de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli dentro de un esquema mas general, a continuación analizaré algunos aspectos de la ecología y la genética de poblaciones bacterianas.

A) Ecología

Los microorganismos del suelo, son responsables de entre el 60 y el 90% de la productividad primaria neta, y de más del 90% de la productividad secundaria en pastizales (Stanton, 1988). Asimismo los microorganismos forman parte esencial de los ciclos biogeoquímicos a nivel global (Jenny, 1980), y constituyen uno de los grupos mas importantes de agentes patógenos para el hombre (Mc Dade y Newhouse, 1986). Sin embargo, esta área tan importante de la ecología, se encuentra muy poco desarrollada debido principalmente a los problemas técnicos que presenta su estudio.

Los progresos en ecología microbiana dependen actualmente en mayor medida, de técnicas complejas de bioquímica, biología molecular, química y física más que de ecología tradicional; ya que el tamaño tan pequeño de los microorganismos descarta la mayor parte de las técnicas directas que se utilizan para el estudio de los organismos multicelulares (Porter, 1988). Por ejemplo, el conteo clásico de bacterias en placa de agar, el cual es método más directo para determinar densidades microbianas, no tiene relevancia en poblaciones naturales. Por otra parte, la eficiencia en la recuperación de especies apartir de cajas de petri puede no ser muy buena (Holben y Tiedje, 1988). Para poder hacer ecología bacteriana uno de los principales problemas a los que se enfrentan los investigadores es la dificultad para identificar de manera confiable a los diferentes individuos dentro de una especie. Tradicionalmente se han utilizado métodos de marcaje

como los serotipos o biotipos, así como patrones electroforéticos para enzimas metabólicas (Selander et al., 1987). Recientemente, se comenzaron a utilizar técnicas de hibridización de ADN (Holben y Tiedje, 1988) que permiten identificar y cuantificar a numerosos taxa de microorganismos del suelo simultáneamente. Sin embargo, la resolución de esta técnica es baja en el caso de identificación y cuantificación de individuos de una misma especie (Holben y Tiedje, 1988). Otras técnicas recientes que permiten identificar, cuantificar, concentrar y separar a poblaciones naturales de microorganismos son: citometría de flujo y "cell sorting", análisis de video microscópico y la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales (Porter, 1988). A pesar de que estos métodos son de gran interés para la ecología microbiana, no tienen muy buena resolución es el caso de identificación de individuos de una misma especie y requieren de gran cantidad de equipo y recursos financieros para su realización (Selander, 1986; Porter, 1988).

El estudio de la ecología de microorganismos, considera como ecosistema al microhábitat donde se desarrollan estos seres vivos, por lo que se habla de la ecología microbiana de la piel (Roth y James, 1988), la ecología microbiana del sistema digestivo de cucarachas (Cruden y Markovetz, 1987), o la ecología de E.coli en el sistema digestivo de vertebrados de sangre caliente (Harlt y Khnizen, 1984).

En cuanto a las densidades bacterianas en estos "ecosistemas" se observó que en la piel varía desde mil hasta un millón de bacterias por cm^2 (Roth y James, 1988); mientras que en el intestino de cucaracha existen densidades bacterianas que van desde 7000 organismos/ml en la parte media del sistema digestivo, hasta un billón de organismos/ml en la parte final del intestino (Cruden y Markovetz, 1987). Por otra parte, las densidades de Echerichia coli varían desde 0.01 individuos/ml de agua pura hasta cien millones de organismos/g en el intestino humano (Harlt y Khnizen, 1984).

Los factores que afectan a las densidades de microorganismos del suelo en un sitio, incluyen la humedad, temperatura, el pH y los nutrientes (Stanton, 1988). Para los microorganismos de la piel, las variables que alteran la composición de la población son: el clima, sitio del cuerpo donde se alojan, edad y sexo del hospedero (Roth y James, 1988). Mientras que para E.coli y otros endoparásitos los factores que afectan la abundancia y frecuencia relativa de algunas cepas son, además de los factores que afectan al hospedero, la presencia de microfauna residente y fenómenos de deriva génica y extinciones periódicas de algunas cepas dominantes (Caughant y Levin, 1980; Harlt y Khnizen, 1984; Crudent y Markovetz, 1987; Selander et al., 1987).

Por otro lado, la distribución espacial de las bacterias varía según el tipo de organismo y sus métodos de dispersión; por

ejemplo, algunas cepas de E. coli tienen una distribución global, existiendo muy poca diferencia entre las bacterias de Estados Unidos de América, Suecia y Tonga (Selander et al., 1987), mientras que otros genotipos de ésta misma bacteria tienen distribuciones muy locales presentándose solamente dentro de una familia (Caugant et al., 1984). Otras bacterias como Rickettsia rickettsii sólo se distribuyen en sitios húmedos de Norteamérica y Centroamérica (Mc Dade y Newhouse, 1986), asimismo, existen bacterias especializadas a microambientes de la piel o de alguna parte del intestino de insectos (Mc Dade y Newhouse, 1986; Cruden y Markovetz, 1987; Roth y James, 1988).

En cuanto a la variación temporal en bacterias, se ha observado que dentro de un solo hospedero, la población de E. coli encontrada durante un año. En éste estudio se identificaron 53 electrotipos diferentes apartir de 550 cepas. De estos, dos se encontraron durante todo el tiempo, mientras que los otros permanecían sólo por algunas semanas. Esto indica que el huésped fué infectado constantemente por nuevas clonas, las cuales en general no pudieron establecerse, por lo que la diversidad observada dentro de un huésped humano es consecuencia de invasiones sucesivas de diferentes genotipos de ésta bacteria patógena (Caugant et al., 1981).

Sobre las interacciones bióticas en microorganismos, se sabe que los microbios del suelo pueden competir, al igual que otros organismos, por nutrientes, agua, espacio, aunque la competencia más significativa se da por el sustrato, es decir, por la fuente de carbono, ya que este es el factor limitante en el suelo (Richards, 1987). Existen dos tipos de competencia que también se pueden aplicar a los microorganismos del suelo: la de explotación de un recurso y la de interferencia; la primera se refiere a cuando una especie es capaz de agotar un recurso aunque no restrinja el acceso a las otras especies, mientras que en la segunda se limita el acceso a un recurso por medio de mecanismos conductuales o químicos (Begon et al., 1986; Roth y James, 1988).

Asimismo, se ha observado que en el suelo la depredación es común, dentro de la microfauna los protozoarios y otros organismos fagotróficos pueden actuar como depredadores, siendo éstos, uno de los agentes reguladores de las poblaciones bacterianas. La parasitosis también es común dentro de los microorganismos del suelo (Alexander, 1984). Los hongos pueden parasitar a otros hongos, las bacterias pueden parasitar a los hongos y éstas ser parasitadas a su vez por virus, así como bacterias del género Bdellovibrio parasitan a otras bacterias como Rhizobium, ejerciendo ésto también una presión sobre las poblaciones bacterianas (Alexander, 1984).

Por otra parte, la sucesión microbiana aporta numerosos ejemplos de comensalismo: los organismos pioneros que colonizan

los restos de plantas descomponen compuestos orgánicos complejos que funcionan como sustrato a los colonizadores secundarios (Richards, 1987). Como ejemplo de mutualismo tenemos la asociación Rhizobium-leguminosa, alga-hongo formando un líquen, ó ejemplos menos conocidos de microbios como Streptococcus faecalis y Actobacillus arabinosis ya que el primero secreta fenilalanina que requiere el segundo mientras que este produce ácido fólico que requiere el primero (Nurmikko, 1965 en Richards, 1987).

B) Genética de poblaciones

La genética de poblaciones nos permite entender la dinámica de las frecuencias alélicas, esto implica conocer los mecanismos que modifican la cantidad y la distribución de la variabilidad genética (Hedrick, 1985). En esta sección se mencionarán tanto los métodos como los datos reportados en la literatura de genética de poblaciones para diversos géneros bacterianos, esto tiene la finalidad de situar los resultados de éste trabajo dentro de un marco de referencia.

El primer paso en el entendimiento de la estructura genética de una población consiste en describir la cantidad de variabilidad genética presente. Hasta hace algunos años esta era una labor difícil por la falta de marcadores que representaran segmentos del genoma. Sin embargo, en 1953 surgió la técnica de la electroforesis de proteínas en gel, siendo ésta aplicada por primera vez en 1966 (Lewontin y Hubby, 1966) para el estudio de poblaciones naturales, gracias a éste método es posible conocer las frecuencias alélicas y por lo consiguiente la variabilidad genética de las poblaciones (Hedrick, 1985). A partir de entonces se han efectuado una gran cantidad de estudios que describen la diversidad genética en poblaciones de eucariotes. Pero no es sino hasta hace relativamente poco tiempo que se han empezado a realizar estudios que permitan estimar la diversidad genética y la estructura genética de poblaciones naturales de bacterias (Selander et al., 1986).

Los métodos que se utilizan para analizar la diversidad genética en bacterias fueron modificados a partir de los métodos estandar para mamíferos (Selander et al., 1987). Por lo que podemos identificar a una cepa por el patrón de migración de estas enzimas, a esto le llamamos electrotipo (ET). Debido a que la carga de una enzima depende directamente de su secuencia de aminoácidos; las variantes de una enzima migraran con diferente velocidad. Al electrotipo de cada enzima se le puede asociar un alelo dentro del locus correspondiente (Selander et al., 1986). La gran ventaja de este método consiste en que podemos hacer una interpretación genética directa de la variación observada (Selander et al., 1987; Young et al., 1987), lo cual es imposible con otros métodos de análisis bacteriológico como el estudio de serotipos, identificación con fagos, y los patrones de

restricción o tinción de proteínas totales .

Cuando se analizan varias enzimas polimórficas, cada una de ellas representada por varios alelos, el número de combinaciones genotípicas posibles es enorme (Selander y Levin, 1980). Sin embargo, en la práctica sólo se encuentran algunos genotipos (menos de 100 en las especies estudiadas más detenidamente), esto se debe en parte al número limitado de cepas obtenidas para cada especie, y a que la mayor parte de las bacterias tienen una estructura clonal, por lo que sólo una fracción de los genotipos posibles se encuentra representada en la población (Selander et al., 1986). El hecho de que la mayor parte de las bacterias presente una estructura clonal, implica una tasa muy baja de recombinación genética en ambientes naturales. Este fenómeno tiene gran relevancia tanto en la estructura genética de las poblaciones naturales de bacterias como en su ecología y en sus patrones evolutivos (Selander y Levin, 1980).

El primer estudio sobre la genética de poblaciones naturales de bacterias lo elaboró Milkman (1973, 1975), quien midió la diversidad genética en 5 loci enzimáticos en E. coli. Este trabajo pionero dió pie a una gran serie de estudios sobre la variación genética en bacterias. Por medio de éstos se observó que las bacterias son en general más diversas que los eucariontes, ya que se han observado, por medio de la electroforesis, diversidades genéticas que varían desde 0 en Shigella sonnei (Selander et al., 1987) hasta de 0.78 en el género Frankia (Gardes et al., 1987), con un promedio de 0.261 para 23 especies bacterianas (Beltran et al., 1988; Caugant et al., 1981; Gardes et al., 1987 ; Musser et al., 1987a; 1987b; 1988; Piñero et al., 1988; Selander et al., 1985; 1987; Young 1985; Young et al., 1987).

Como parte del análisis de la diversidad genética, ésta el estudio de las distancias genéticas entre las cepas de un grupo bacteriano, por medio de esto podemos obtener dendrogramas donde se manifiesten las relaciones genéticas entre los aislados de una población. Encontrando que existen especies bacterianas muy heterogéneas como Haemophilus influenzae (Musser et al., 1988), Bordetella bronchiseptica (Musser et al., 1987b) y H. pleuropneumoniae (Musser et al., 1987a), donde la distancia máxima es mayor a 0.5; mientras que E.coli (Selander et al., 1987), Salmonella spp. (Beltran et al., 1988) y Legionella pneumophila (Selander et al., 1985) presentan dendrogramas más homogéneos con una distancia máxima menor a 0.46.

Para poder, tener mas información sobre como esta estructurada esta diversidad dentro de las poblaciones bacterianas, se puede utilizar un índice "Gst" (Nei 1974; 1986) el cual nos indica como está organizada la diversidad entre subpoblaciones. Este índice nos puede mostrar, que tan jerarquizada se encuentra la

diversidad dentro de una población, así como darnos indicios de la estructura de la población, así como sus formas de dispersión.

Se ha observado que existen bacterias como Escherichia coli donde no existe una diferenciación entre subpoblaciones de diferentes continentes, ni entre diferentes fuentes de infección (Selander et al., 1987) lo cual indica la estructura clonal de esta bacteria y su amplia dispersión. Para éste mismo organismo patógeno se observó que existen algunas diferencias entre las cepas que colonizan a los niños que a los adultos (Selander y Levin, 1980) , mientras que en otras bacterias patógenas se ha observado que no hay grandes diferencias entre subpoblaciones que infectan a hospederos de diferentes especies (Musser et al., 1987b). Por otra parte, en E. coli se encuentra que existe una pequeña diferenciación entre las subpoblaciones identificadas por electroforesis, patrón de proteínas totales y biotipos (Selander et al., 1987), lo cual nos podría sugerir que estos métodos son equivalentes para la identificación de cepas de esta bacteria. Asimismo se encontró para Haemophilus pleuropneumoniae (Musser et al., 1987a) y para H. influenzae (Musser et al., 1988) una fuerte diferenciación entre serotipos diferentes; lo cual nos puede indicar que este método de identificación separa adecuadamente a las poblaciones de este género. Este mismo género presenta una alta diferenciación geográfica (Musser et al., 1987a; Musser et al., 1988), por lo que podemos suponer que los mecanismos de dispersión de esta bacteria de las vías respiratorias son menos efectivos que los de E. coli.

IV.- Phaseolus vulgaris Y P. coccineus L.

En éste trabajo se analizará la interacción frijol-rizobio, a continuación se presenta una revisión bibliográfica sobre los dos miembros de la asociación.

A) **Biología General y proceso de domesticación**

P. vulgaris se conoce como frijol común, y pertenece a la subtribu Phaseolinae, tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionaeae de la familia Leguminosae; (Marechal, 1978; Allen y Allen, 1980).

Se ha descrito que Phaseolus vulgaris se autopoliniza lo cual eventualmente produce líneas puras, todas las plantas dentro de una variedad son homocigas o están muy emparentadas entre si. Sin embargo, existe una gran diversidad genética dentro de la especie, básicamente entre variedades, aunque se sospecha que también puede haber diversidad dentro de una variedad en su sitio de origen, particularmente en las llamadas "land race" (Kaplan, 1981).

Exploraciones botánicas realizadas en México han mostrado que las variedades de frijol común silvestre Phaseolus vulgaris

L. crecen a lo largo de la Sierra Madre Occidental en la franja de transición ecológica entre el bosque mesófilo y la selva baja caducifolia, situada entre los 1500 y 1800 msnm. En esta area crecen diversas especies del género Phaseolus. Por otro lado, en esta misma región se han encontrado los restos arqueológicos más antiguos de frijol cultivado que se conocen en México (Miranda Colín, 1967; Delgado et al., 1988).

Se trabajo también con otra especie de este mismo género, denominada Phaseolus coccineus L. la cual se conoce como frijol ayocote, se ha observado que P.coccineus L. ssp. formosus silvestre, presenta una distribución más amplia que P.vulgaris L. silvestre, ya que este se encuentra en las zonas montañosas de clima templado de México entre los 1,000 y 2,800 msnm, en Guatemala crece a elevaciones similares a las de México. P.coccineus L. spp.formosus es un taxa muy polimórfico que incluye principalmente especies silvestres, aunque en algunas regiones es casi imposible delimitar poblaciones silvestres que no hayan estado sometidas al flujo génico de plantas domesticadas (Marechal et al., 1978). A diferencia de P.vulgaris L. la cual es una planta anual, P. coccineus L. presenta poblaciones perennes, con una raíz tuberosa (Miranda Colín, 1979). Se considera que esta planta es nativa de México y Guatemala (Vavilov, 1949). Por otra parte, la subespecie cultivada del frijol ayocote P. coccineus L. spp. coccineus L.se considera como la contraparte domesticada de P.coccineus L. spp. formosus (Delgado, 1988).

En cuanto al origen de la domesticación de Phaseolus vulgaris, se sabe que en América del Sur también existen variedades de frijol silvestre denominado P. aborigennus así como restos arqueológicos más antiguos que los mexicanos, entre los 8,000-10,000 años mientras que los encontrados en mesoamérica tienen una antigüedad de cerca de 7,000 años (Berglund-Brucher y Brucher, 1976). Estos datos han generado una gran controversia sobre el sitio de origen del frijol común, existiendo varias teorías al respecto (Gentry, 1969; Kaplan, 1965; Kaplan, 1981; Delgado et al., 1988; Gepts, 1988). Sobre el frijol ayocote se creó que el centro de origen está localizado en México y el norte de Guatemala (Kaplan y Kaplan, 1988).

IV.-RHIZOBIUM

Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli es un organismo sumamente interesante, tanto por su biología como por su importancia económica, ya que es esta bacteria la responsable de la fijación de nitrógeno en el frijol, por lo que el estudio cuidadoso de su ecología y de su estructura genética, podrá repercutir en un mejor uso agrícola de esta asociación. A continuación describiré la información general sobre Rhizobium así como los conocimientos que se tienen sobre su ecología y genética de poblaciones.

A) Biología general y Sistemática

Se considera que los rizobia son bacilos móviles gram negativos, con 0.5-0.9 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo (Bergey, 1984). Tradicionalmente se clasificaba a una bacteria como Rhizobium por el sólo hecho de nodular en leguminosas (Vincent, 1980; Elkan, 1981). Actualmente se ha considerado que este grupo esta formado por dos géneros que difieren en su estructura celular, requerimientos alimenticios y tiempo de crecimiento. Estos son Rhizobium y Bradyrhizobium. El otro género de la familia Rhizobiaceae es Agrobacterium, que presenta bacterias patógenas que producen agallas en las plantas (Elkan, 1981). Estudios recientes con ARN ribosomal de la fracción 16S indican que los rizobios son un grupo polifilético. Rhizobium se encuentra más cerca filogenéticamente de Agrobacterium que de Bradyrhizobium quien se encuentra cercamente emparentado con bacterias fotosintéticas como Rhodopseudomonas palustris (Young y Johnston, 1989). Debido a la gran distancia que existe entre Rhizobium y Bradyrhizobium, bajo la hipótesis de el reloj molecular universal, se supone que el ancestro común de los rizobios capaces de nodular en leguminosas es anterior al origen de las Angiospermás. Este hecho, plantea preguntas interesantes sobre el origen la esta relación simbiótica, así como sobre la importancia evolutiva de la transferencia horizontal en bacterias (Young y Johnston, 1989).

Por otra parte, no todos los Rhizobium nodulan en todas las leguminosas, sino que existe cierta especificidad de algunos grupos de bacterias por algunas leguminosas (Allen y Allen, 1980). A medida que se fue conociendo más a estas bacterias se observó que la especificidad a un huésped no era un caracter taxonómico suficiente por lo que actualmente se clasifica al género de acuerdo a su patrón de proteínas totales, ácidos nucleicos y hospederos donde nodulan (Bergey, 1984).

Actualmente se considera la siguiente clasificación de Rhizobiaceae: Existen tres géneros en este grupo de bacterias, el primero produce agallas en las plantas y se le denomina Agrobacterium, los otros dos géneros son capaces de fijar nitrógeno en los nódulos de las raíces de las leguminosas, siendo Rhizobium los rizobia de crecimiento rápido, que presentan colonias de 2 a 4 mm de diámetro despues de incubarlas en medio PY-agar, produciendo ácido en el medio de cultivo; mientras que el otro género, denominado Bradyrhizobium es de crecimiento lento, formando colonias pequeñas de cerca de 1 mm de diámetro despues de 7 días en incubación en un medio PY-agar al cual transforman en un medio alcalino. Ambos géneros también se diferencian en su contenido de guanina-citocina y en su metabolismo energético (Bergey, 1984). Se considera que el género Rhizobium presenta básicamente 4 especies, segun la leguminosa a la que son capaces de nodular: R. meliloti que nodula en

Medicago, R. loti capaz de nodular en Lotus, R. fredii fija nitrógeno en soya (Glicine) y R. leguminosarum el cual cuenta con tres biovares: . vicea que nodula en chicharo (Pisum) y haba (Viceae), trifolii que nodula en trebol (Trifolium) y el biovar phaseoli que nodula en Phaseolus. Dentro del género Bradyrhizobium sólo se considera una especie bien definida: B. japonicum capaz de nodular en soya, aunque existe un grupo heterogéneo de bacterias denominadas "cowpea rhizobia" que nodulan en leguminosas silvestres a las cuales se les agrupa en Bradyrhizobium spp. (Bergey, 1984).

Sin embargo, como demostraron Piñero y colaboradores (1988), esta clasificación es poco realista, ya que solamente dentro de 46 aislados de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli se obtuvo para 15 loci la mayor diversidad genética reportada para bacterias ($H=0.691$); ello indica que este es un grupo sumamente heterogéneo de bacterias todas ellas capaces de nodular efectivamente en frijol. Por lo que estos autores sugieren que se elabore una nueva clasificación de este género bacteriano basada en la variación del genoma cromosómico y no en características fenotípicas, en especial aquellas que se encuentran codificadas en plásmidos, como es el caso de los genes de la nodulación y la especificidad en Rhizobium.

B) Ecología

1.- Métodos:

El método más antiguo para conocer el número de rizobia en el suelo es la técnica del "número más probable". En ella, la muestra de suelo es diluida, y porciones de las diluciones son aplicadas a leguminosas. Aquellas plantas que nodulen son marcadas como positivo, con una tabla de números más probables y la dilución final con la que se obtuvo un positivo se obtiene la densidad original en el suelo (Alexander, 1984; Lawson et al., 1987). Por medio de este método, se ha observado que las densidades de esta bacteria varían desde 10 organismos/g de suelo en la época de sequía, hasta cien mil bacteroides/g dentro de los nódulos maduros, siendo la densidad promedio en la rizósfera de un millón de individuos por gramo de suelo (Alexander, 1984). Sin embargo, a pesar de la gran importancia agronómica de esta bacteria, y a las grandes densidades que puede presentar en las leguminosas en las que nodula, la ecología de Rhizobium se encuentra poco desarrollada, debido principalmente a los problemas técnicos para poder identificar a los individuos. En el caso de el estudio de poblaciones de Rhizobium se han utilizado numerosos métodos de identificación, uno de ellos es la presencia en las cepas de marcadores genéticos como la resistencia a ciertos antibióticos (Bushby, 1981; Hassan et al., 1986), de tal manera que se puede seguir el comportamiento de una cepa en especial. Otro lo constituye el uso de inmunofluorescencia (Schmidt, 1974) para cuantificar a microorganismos específicos en su medio

natural. Sin embargo, el método de identificación de Rhizobium más conocido es el de los serotipos, el cual marca a ciertos antígenos de membrana de las bacterias que se quiere estudiar (Brockell y Dudman, 1968; Kaplusta y Rouwenhorst, 1973; Robert y Schmidt, 1985; Kamicker y Brill, 1986; Lieberman et al., 1986). La utilización de serotipos para la identificación de individuos de una sola especie no es muy buena debido a que se ha demostrado que los antígenos de membrana pueden estar sujetos a selección, por lo que dentro de un solo serotipo se pueden encontrar diferentes individuos (Beltran et al., 1988).

El uso de la electroforesis en gel para poder identificar cepas de Rhizobium y así conocer su ecología es muy reciente. Young et al. (1987) describen la distribución espacial en la población y dentro de cada raíz de los 249 nódulos analizadas, de Rhizobium leguminosarum biovar vicea asociado a 9 plantas de Pisum sativa en Inglaterra. Estos autores encontraron que la distribución de las cepas es heterogénea cuando se consideran poblaciones de raíces primarias y secundarias dentro de una sola planta y también cuando se comparan poblaciones del nódulo y del suelo. Asimismo, se demostró que el tamaño de las zona donde se encuentra cada cepa es pequeño por lo que se puede predecir que bacterias relacionadas ocupan nódulos vecinos. Otro estudio es el realizado por Eardly et al. (1987) donde evalúan el efecto de variables ambientales en la diversidad de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a frijol común en 6 sitios en Colombia. Se encontró que existen diferentes tolerancias a temperaturas altas y pH críticos entre los diversos electrotipos (ET), siendo estos factores ambientales más importantes que los factores agronómicos en la determinación de la variabilidad genética. Demezas et al. (1988) realizaron un análisis de la ecología de Rhizobium trifolii en Australia, utilizando simultáneamente diversas técnicas para identificar a los individuos y determinar su estructura genética. Los métodos aplicados en este estudio fueron: enzimas de restricción para identificar polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de ADN, hibridización de ADN en genes específicos del cromosoma y del plásmido sym, y electroforesis en gel para 16 loci diferentes.

2.-Factores que afectan las poblaciones de Rhizobium

Existen una serie de factores bióticos y abióticos que pueden afectar las densidades de Rhizobium en el suelo y por consiguiente alterar el número de nódulos efectivos en las leguminosas a las que se asocian estas bacterias (Alexander, 1984). El estudio de estos es de gran importancia ecológica y agronómica ya que los problemas en la nodulación efectiva por bajas densidades de Rhizobium en las etapas tempranas y tardías del desarrollo de la planta, pueden dar lugar a una gran reducción en su productividad (Bushby, 1981).

2.1.-Acidez, Alcalinidad y Salinidad del suelo

En los suelos tropicales donde la lluvia excede a la evapotranspiración, es común encontrar suelos ácidos, debido a que el calcio y el magnesio se pierden por lixiviación dejando libre grandes concentraciones de aluminio, manganeso y de iones hidrógeno (Jenny, 1980). Se ha demostrado que Bradyrhizobium y Rhizobium originarios de éstos sitios son más tolerantes a la acidez que aquellos de origen templado (Mulongoy et al., 1981). Por ejemplo, en R.leguminosarum biovar viceae asociado a chícharo; se observó que tanto el desarrollo de Rhizobium como su capacidad de fijar nitrógeno se ven inhibidos a pH menores de 5.6 (Evans et al., 1980 en Subba Rao, 1984).

Los suelos salinos y alcalinos son comunes en regiones áridas o semi-áridas, donde el transporte de sales solubles no ocurre por la falta de lluvia, depositándose éstas en el suelo (Webster y Wilson, 1980). Rhizobium presenta un rango amplio de sensibilidad hacia la salinidad, no se encontró correlación entre la habilidad de esta bacteria para tolerar la salinidad y su sitio de origen (Singleton et al., 1982). La textura del suelo también puede alterar el efecto de la salinidad sobre Rhizobium, la sobrevivencia es mayor en aquellos suelos con más materia orgánica y más arcilla que en los suelos arenosos (Subba Rao, 1984). En el desierto de Sonora se encontró que la sobrevivencia de Rhizobium asociado a mesquite (Prosopis spp.) puede explicarse en términos de su habilidad para acumular L-glutamato intracelularmente a altas concentraciones.

2.2.-Humedad

La falta de humedad es un factor crítico para la sobrevivencia de Rhizobium (Alexander, 1984). Existen dos etapas de mortandad bacteriana durante la época de sequía, la primera ocurre al principio de la estación, cuando se pierde el agua del suelo, en ella la mortandad de Rhizobium es rápida. En la segunda etapa, hay un decaimiento más lento de la población, después de que el suelo ha alcanzado su estado seco constante (Peña-Cabriales y Alexander, 1979). Al probar la tolerancia de diferentes cepas de Rhizobium se encontró que la densidad poblacional cae aproximadamente dos ordenes de magnitud, en un ciclo de secas. No se presentaron cepas resistentes a la sequía después de varios ciclos de cultivo y de sequía. La existencia de materia orgánica no disminuye el efecto de la falta de agua sobre estas bacterias (Peña-Cabriales y Alexander, 1979). En otro estudio se encontró que el porcentaje de sobrevivencia de R.japonicum esta directamente relacionado con la cantidad de agua que queda en el suelo durante la sequía y con la humedad relativa (Osa-Afiana y Alexander, 1982). Por otra parte, se observó que Bradyrhizobium sobrevive mejor a la desecación en suelos arenosos que Rhizobium (Bushby y Marshall, 1977a).

Las inundaciones son comunes en los trópicos húmedos y semi-

húmedos. Bajo estas condiciones también existe un rápido decaimiento en las densidades de Rhizobium al principio de la inundación, estabilizándose posteriormente las poblaciones (Osa-Afiana y Alexander, 1982). Debido a que estas bacterias son aeróbicas, las condiciones de anaerobiosis que ocurren bajo el agua, afectan directamente la sobrevivencia. Sin embargo, algunas de ellas, en particular cepas de Bradyrhizobium, son capaces de utilizar nitrato como aceptor de electrones bajo anaerobiosis por lo cual sobreviven exitosamente a las inundaciones (Zablotowicz et al., 1978) incrementando inclusive sus densidades (Daniel et al., 1982).

2.3.-Temperatura

Las temperaturas máximas son más altas en las regiones secas que en las regiones húmedas, por lo que a la presión de sobrevivir a la sequía hay que agregarle el efecto de las altas temperaturas (Alexander, 1984). Al probar la resistencia de Rhizobium a las altas temperaturas, se encontró que sólo unas cuantas cepas sobreviven temperaturas mayores de 38 °C (Bowen y Kennedy, 1959). Cuando se agregó arcilla a los suelos arenosos mejoró la sobrevivencia de Rhizobium a las altas temperaturas pero no así la de Bradyrhizobium (Marshall, 1964). El aislamiento de varias cepas de Bradyrhizobium, originarias de ambientes secos y cálidos en la sabana africana mostró que todas ellas eran tolerantes a temperaturas altas (Eaglesham et al., 1981). Sin embargo, esto mismo no ocurrió con cepas aisladas de lugares cálidos y secos en Australia, probablemente porque en el sitio de origen las temperaturas son menos extremas (Bowen y Kenedy, 1959).

También existen problemas de fijación de nitrógeno, desarrollo y nodulación de Rhizobium a bajas temperaturas; aunque existe una gran variabilidad en esta respuesta. Subba Rao (1984) encontró en frijol, que disminuía la fijación de nitrógeno a temperaturas bajas, aunque éste efecto dependía del tipo de frijol, existiendo una variedad resistente al frío. Posteriormente, éste mismo autor encontró que en esta variedad de frijol resistente si se produce la nodulación y la fijación de nitrógeno, aunque ésta se ve retrasada en comparación con cultivares de zonas calidas.

2.4.- Factores ambientales combinados.

En el primer estudio donde se observó el efecto combinado de diversas variables ambientales como la temperatura y la luz, así como niveles diferentes de amonio y nitrato, en la nodulación de Vigna sinensis por Bradyrhizobium, se encontró que la nodulación se ve significativamente afectada por todos estos factores, existiendo una condición óptima para cada variable. La temperatura también influyó en el peso seco de los nódulos por planta, así como el tamaño y la estructura de los mismos (Dart y Mercer, 1965). En un estudio posterior realizado en soya nodulada por

R. japonicum se observó que tanto la temperatura como la cantidad de luz afectan el crecimiento, la nodulación y la fijación de nitrógeno, existiendo un óptimo de 15 a 30 °C de temperatura y un 18% de sombra para obtener los rendimientos más altos de soya (Trang y Giddens, 1980). Lawson et al. (1987) encontraron que la densidad de Rhizobium leguminosarum biovar trifolii es afectada significativamente de manera positiva por la altura de la vegetación y por la radiación solar, pero no así por la temperatura, la precipitación, el tipo de suelo ó el potencial mátrico del suelo.

2.5.-Interacciones bióticas.

Existen factores bióticos como la competencia y la depredación que afectan las densidades de Rhizobium en la rizósfera (Alexander, 1984).

La depredación por parte de protozoarios no tiene un efecto importante en la población de Rhizobium en el suelo (Alexander, 1984), ya que al mismo tiempo que los protozoarios atacan a las bacterias, estas se multiplican a una tasa más alta compensando el efecto de los depredadores. Esto mismo ocurre con la muerte de Rhizobium por bacteriófagos (Alexander, 1981). Sin embargo, las grandes densidades de fagos que atacan a Rhizobium observadas en estudios posteriores, dejan abierta la posibilidad de que la interacción tenga algún impacto sobre la dinámica poblacional de Rhizobium. Se observó que éste efecto no altera la abundancia de ésta bacteria, ya que existe una correlación positiva entre ambos organismos, sino que los bacteriófagos pueden alterar la estructura genética de la población, al seleccionar variantes resistentes a ellos o promover el intercambio genético (Lawson et al., 1987).

Por otro lado, la competencia intraespecífica por nodular en las leguminosas parece ser importante en la estructura de poblaciones naturales de Rhizobium (Dowling y Broughton, 1986). Este efecto cobra importancia en el caso la de introducción de cepas comerciales de Rhizobium en sitios donde existen cepas locales bien adaptadas a su medio. Frecuentemente se ha observado, que cuando se inoculan semillas con cepas mejoradas, las plantas nodulan con cepas locales de Rhizobium menos efectivas para fijar nitrógeno (Dowling y Broughton, 1986). Aún en el caso de que durante el primer año, la inoculación sea efectiva, estas cepas comerciales generalmente no persisten en las siguientes estaciones (Mc Loughlin et al., 1984 y Meade et al., 1985).

B) Genética de poblaciones

A pesar de que los primeros estudios sobre genética de poblaciones bacterianas se iniciaron con Milkman en 1970; es hasta 1985 cuando Young realiza el primer trabajo de genética de

poblaciones de Rhizobium, a partir de este estudio sólo se han realizado otras 4 investigaciones al respecto (Young et al., 1987; Eardly et al., 1987; Demezas et al., 1988 y Piñero et al., 1988) de las cuales se observa que esta bacteria presenta una diversidad muy alta en poblaciones naturales, asimismo se observa que las diferenciaciones entre subpoblaciones reportadas por Young et al (1987) y por Piñero et al. (1988) son muy bajas y que los dendrogramas descritos en estos dos estudios presentan gran heterogeneidad, por lo que se observan distancias máximas mayores a 0.5. Asimismo, en estos estudios se ha demostrado que la estructura genética de Rhizobium es clonal.

El poco conocimiento que se tiene sobre la estructura genética de esta bacteria en condiciones naturales, indica que es de suma importancia efectuar estudios al respecto, sobre todo en los países de origen de la interacción leguminosa-rizobio.

OBJETIVOS

Esta tesis se estudia la estructura poblacional de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado tanto a Phaseolus vulgaris como a P.coccineus cultivado y silvestre en 3 localidades de Morelos. El análisis de las siguientes preguntas podrán dar una idea mas clara de como esta estructurada la población de esta bacteria ya sea en una parcela cultivada como en un sitio de frijol silvestre.

¿ Cómo es el ambiente edáfico en los sitios de estudio? y si tiene esto alguna relación con la diversidad y estructura de las poblaciones de Rhizobium que ahí se encuentran.

¿ Cómo es la abundancia de los aislados de esta bacteria en cada sitio asociado a frijol común, en los dos años de estudio? ¿Cómo estan distribuidas espacialmente estas cepas, tanto a nivel poblacional como intraplanta? ¿cuales son sus patrones de diversidad y dominancia? ¿qué similitudes existen entre ambos sitios?

¿ Qué tanta diversidad genética existe en cada sitio y en cada año? y ¿cómo está estructurada ésta diversidad dentro de los diversos niveles de organización?

¿ Cómo se distribuyen las distancias genéticas entre las bacterias asociadas a las dos especies de frijol estudiadas ? ¿Qué relación presentan las poblaciones silvestres con las cultivadas?

¿ Cómo cambia la estructura de la población de Rhizobium cuando esta bacteria se encuentra asociada a dos especies muy emparentadas de frijol: P.vulgaris y P.coccineus tanto silvestre como cultivado?

¿ Cómo es la diferenciación entre subpoblaciones de Rhizobium?

MATERIAL Y METODO

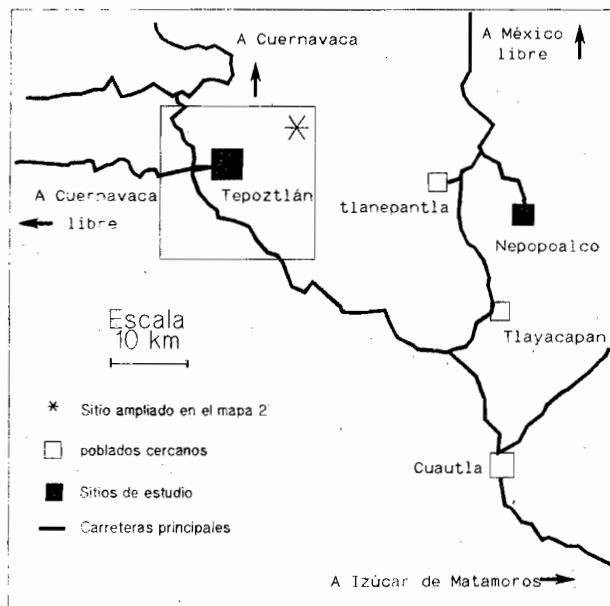
I.-DESCRIPCION DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

Este trabajo se realizó en tres sitios de estudio: el primero esta ubicado en un rancho en Santiago Tepetlapa, Morelos, donde se cultiva frijol de mata negro en dos parcelas contiguas; en él se colectaron los nódulos asociados a Phaseolus vulgaris L. cultivado. El segundo sitio se encuentra en el Km 5.5 de la carretera de cuota hacia Tepoztlán Morelos; en el se colectaron los nódulos asociados a Phaseolus vulgaris L. silvestre y a P. coccineus L. silvestre y cultivado (Figura 1). El tercer sitio se encuentra en Nepopoalco Morelos, en él se colectó R. leguminosarum asociado a P. coccineus L. spp. formosus silvestre.

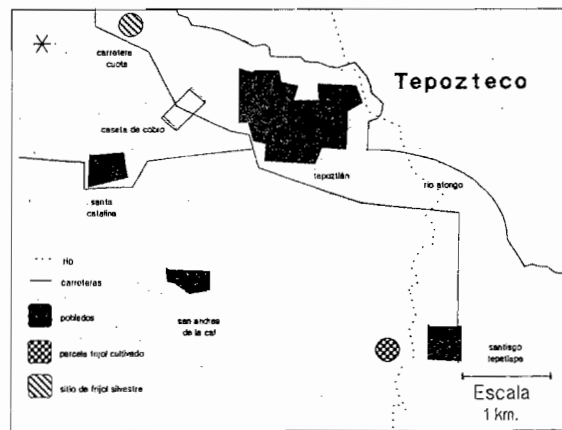
A) Sitio de cultivo de Phaseolus vulgaris L. cultivado

Santiago Tepetlapa se encuentra a 5 kilómetros del pueblo de Tepoztlán Morelos (Figura 1), presenta una altitud de 1500 msnm en las coordenadas 99°05' de longitud y 18°59' de latitud. Presenta una precipitación promedio anual de 1000 mm, una temperatura media anual de 20°C. En esta región, el suelo se clasifica como feozem, siendo el suelo predominante un feozem háplico, mientras que el suelo secundario se considera feozem pélico con textura media (DETENAL, 1979). La mayor parte de esta zona se encuentra cubierta por parcelas cultivadas, mientras que en los montes cercanos hay selva baja caducifolia. El clima se clasifica como templado con verano lluvioso y cálido y con poca oscilación de temperatura (García, 1988). En este sitio hay una temporada de secas que va de mediados de noviembre hasta principios de mayo; mientras que la de lluvias es en el verano-otoño con un pico en septiembre (García, 1988).

La parcela de frijol cultivado se encuentra en el pueblo de Santiago Tepetlapa Morelos en un rancho propiedad del Sr. Benjamín Shalkwijk. En éste se cultiva frijol de temporal, cacahuate en ocasiones, aguacate, cítricos, alfalfa, calabaza, maíz y árboles frutales como guayabos, mangos y ciruelos. Existen dos parcelas (Figura 2 y 3) en terraza donde se cultiva frijol negro de mata en la época de lluvias, en ambas hay una larga historia de cultivo de esta leguminosa, encontrándose inclusive restos precolombinos que indican actividad agrícola en esta zona (obs.personal). El frijol lo siembran solo y en algunas partes de la parcela lo siembran junto con maíz. La técnica de siembra es la tradicional de la zona, la cual implica barbechar el suelo, hacer los surcos con arado de mula, sembrar a mano las semillas,



mapa 1



mapa 2

Figura 1: Mapa de la zona de Morelos donde se realizaron las colectas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a frijol común cultivado y silvestre

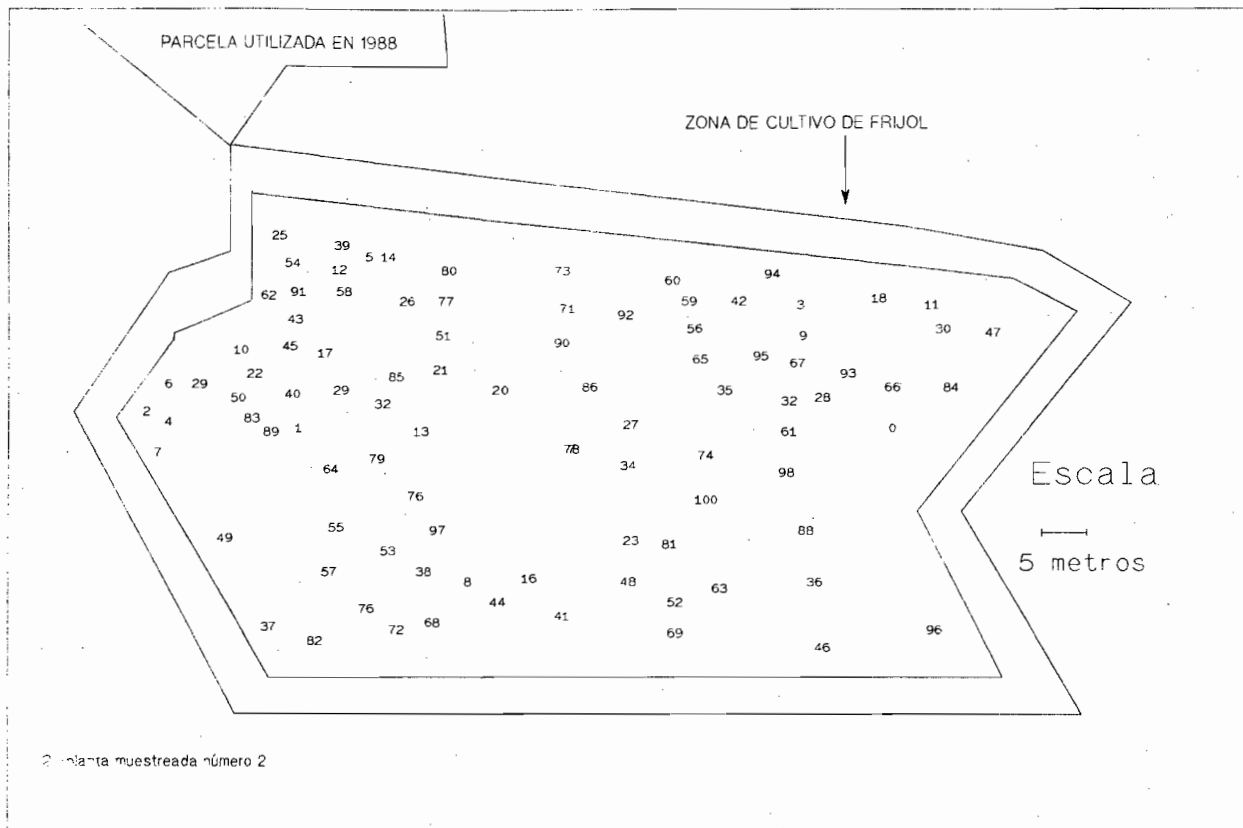


Figura 2: Mapa de la parcela de *Phaseolus vulgaris* cultivado donde se colectó *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* durante 1987. Esta se encuentra en Santiago Tepetlapa, Morelos

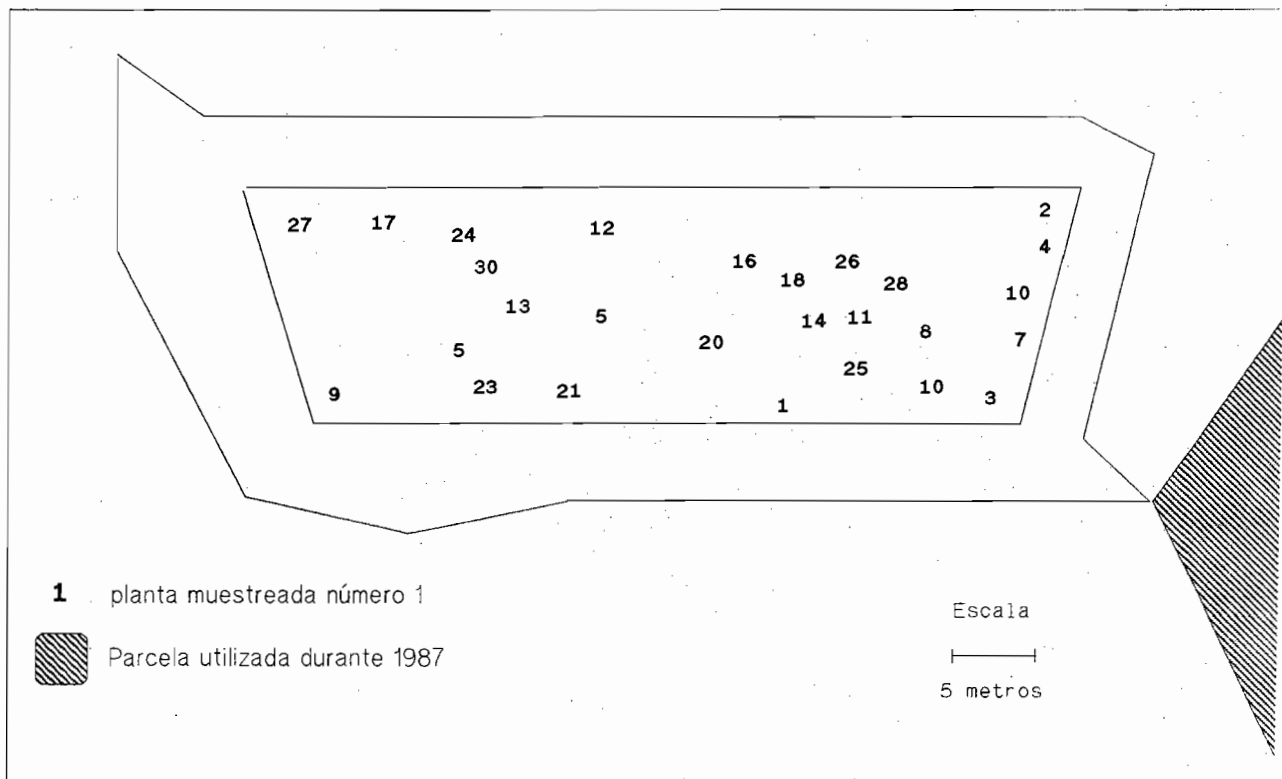


Figura 3: Mapa de la parcela de Phaseolus vulgaris cultivado donde se colecto Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli durante 1988. Esta se encuentra en Santiago Tepetlapa, Morelos.

aplicar fertilizante nitrogenado (sulfato de amonio) cuando empieza la floración y recolectar las semillas a mano. Se utilizaron las dos parcelas durante este trabajo, la parcela grande de aproximadamente 3600 m², se encuentra en la terraza inferior (Figura 2), en ella se efectuó la colecta de 1987; y la parcela más pequeña de cerca de 600 m², que se encuentra a 10 metros de la primera en una terraza inmediatamente superior (Figura 3). Debido a que en verano de 1988 se inundó la parcela grande, en este año se decidió colectar en la parcela pequeña, la cual, por estar más alta, no se inundó.

B) Sitio de Phaseolus vulgaris L. silvestre y P. coccineus L. silvestre y cultivado en Tepoztlán, Morelos

El sitio de Phaseolus vulgaris L. y P. coccineus L. silvestre se encuentra sobre la carretera de cuota a Tepoztlán en el km 5.5 en la orilla de un encinar muy perturbado (Figura 4). Este sitio es un manchón de vegetación arbustiva que se encuentra rodeado por pastizales y vegetación secundaria. El lugar de colecta es muy pequeño de aproximadamente 300 m², siendo este el único sitio donde se encuentra P. vulgaris silvestre en el área (A. Delgado com. pers). También observamos P. coccineus, y P. marechalis. Así como otras leguminosas arbóreas. Este sitio, a pesar de que se encuentra a escasos 4 km en línea recta de Santiago Tepetlapa, es diferente a este, en clima, suelos y vegetación. El sitio de Phaseolus vulgaris y P. coccineus L. spp. formosus silvestre se encuentra a 1850 msnm en las coordenadas 99° 07' de longitud y 19° 00' de latitud, presenta una precipitación media anual de 1100 mm, una temperatura media anual de 19°C, la profundidad del suelo es mayor a los 10 cm, el drenaje horizontal del suelo es bueno debido a que la pendiente es fuerte en esta zona, la cual presenta un suelo predominante de tipo litosol con un suelo secundario litosol hámico y textura media (DETENAL, 1979). Se colectó P. coccineus L. spp. coccineus cultivado a escasos metros del sitio de los frijoles silvestre, este sitio se caracteriza por estar en la parte alta de una pequeña loma donde se extiende una parcela de frijol ayocote cultivado, debido a que el cultivar se encontraba rodeado de alambre de púas, se colectaron todas las plantas de P. coccineus que se encontraban en la orilla de la parcela, en un bosque de encino.

C) Sitio de P. coccineus L. spp. formosus en Nepopoalco

Se encuentra en el km. 41 de la carretera federal Xochimilco-Oaxtepec, a una altitud de 2200 msnm, siendo la vegetación dominante la de bosque mixto pino-encino con muchos elementos de origen tropical en el sotobosque (Bárquez y SaruKhán 1984). Se colectaron todas las plantas de P. coccineus L. que se encontraron en la zona. Este sitio presenta un clima similar al observado en el sitio de colecta de P. vulgaris silvestre (García, 1988).

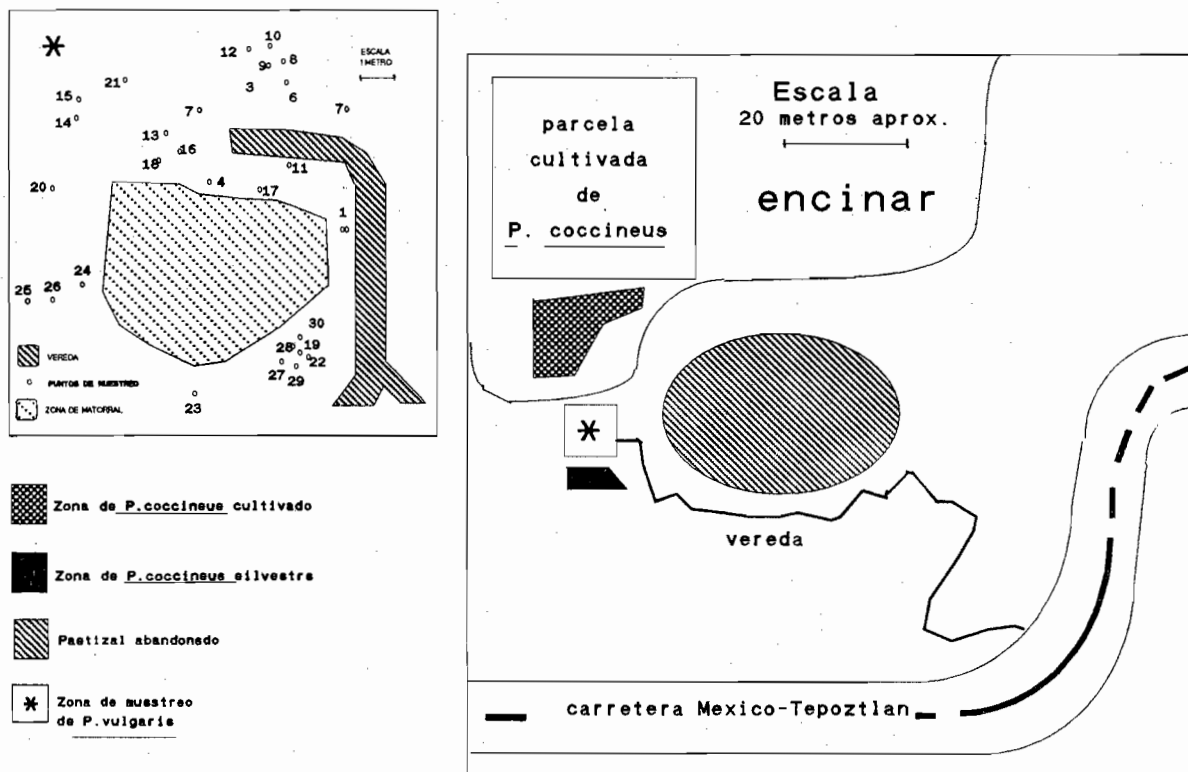


Figura 4: Mapa de la zona de muestreo de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a Phaseolus vulgaris silvestre y a P. coccineus silvestre y cultivado en el km 5.5 de la carretera a Tepoztlán, Morelos.

II.-COLECTA Y MANEJO DE LAS CEPAS DE Rhizobium

A) Colecta de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a frijol cultivado y silvestre.

Para la colecta de Rhizobium asociado a frijol común cultivado, durante 1987; se eligieron al azar 100 plantas de aproximadamente un mes de edad (cuando empieza la floración). Para cada una de ellas, se tomó con una pala pequeña, una muestra del suelo que se encontraba alrededor de cada planta (aproximadamente 15 cm² por planta) y posteriormente, se cuantificó para cada planta muestreada, el largo, diámetro basal, número de hojas, de flores y de frutos. De las 100 plantas se obtuvo un solo nódulo por planta, salvo en una planta elegida al azar donde se extrajeron todos sus nódulos. Durante 1988 se muestrearon aleatoriamente en la parcela contigua 32 plantas tomando las mismas mediciones que el año anterior; en esta ocasión se aislaron todos los nódulos de cada planta.

En el sitio de Rhizobium asociado a frijol común silvestre, tanto en 1987 como en 1988, se siguieron los mismos métodos que para las parcelas de frijol cultivado, pero se muestrearon las plantas del mismo sitio en ambos años.

En el caso de las colectas de rizobios asociados a P.coccineus durante 1988, se muestrearon todos los nódulos maduros de todas las plantas que se encontraron en cada sitio.

Tanto en las poblaciones silvestres como en las cultivadas, se mapearon las plantas dentro de cada sitio, y los nódulos dentro de cada planta.

B) Aislamiento y purificación de cepas, obtención de las proteínas de Rhizobium.

Los nódulos colectados se lavaron con cuidado para extraer todos los residuos de tierra. Cada uno de ellos se colocó en un tubo Ependorff de 1.5 ml etiquetado, se le aplicó a cada uno 1 ml de hipoclorito de sodio al 15% durante 5 minutos, enjuagándolos posteriormente 3 veces con agua estéril. Se prepararon cajas de Petri con medio de cultivo PY (Anexo 1) dejándolas enfriar. Cada nódulo fue exprimido con unas pinzas esterilizadas al fuego. Posteriormente, el líquido rosado que sale del nódulo fue estriado en la caja con medio de cultivo. Las cajas etiquetadas fueron colocadas en un estufa a 30 °C por 5 días (Martínez, 1985).

Una vez crecidas las colonias bacterianas que se presentaban en el nódulo, se aisló una de ellas que presentara el color y forma características de Rhizobium, esta fué estriada en una caja de Petri con medio de cultivo, de tal manera que se pudieran obtener colonias aisladas. Las cajas etiquetadas fueron incubadas a 30 °C por 3 días. Con el propósito de tener cepas puras se

repitió este proceso 3 veces.

En el caso del análisis de diversidad intranódulo, efectuado con la colecta de 1987, se extrajeron 100 colonias de Rhizobium de un nódulo elegido al azar y de otros 3 nódulos se aislaron 20 colonias de cada uno para poder tener réplicas; con estas colonias se repitió el proceso de purificación mencionado anteriormente.

Para cada cepa purificada se tomo una muestra abundante con un palillo estéril y se resuspendió en 1 ml de glicerol al 50% y se colocó en un frasco etiquetado, a -70 °C. Esto se hizo con la finalidad de preservar la cepa para estudios posteriores (Martínez, 1985).

Ya que se tuvo un cultivo puro de Rhizobium se procedió a crecerlo en 150 ml de medio de PY líquido (Anexo 1), incubandolo por un día a 30 °C con agitación constante. El cultivo crecido fue centrifugado a 5000 rpm durante 8 minutos, en una centrifuga ultrarápida SORVALL con rotor S-H4, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 3 ml de medio PY líquido. Posteriormente, con la finalidad de obtener las proteínas de cada cepa, se expuso el botón resuspendido a 2 pulsos, de 1 minuto cada uno, de 80 Hz de ultrasonido, utilizando un sonicador BRANSON 250/450. Las proteínas obtenidas fueron colocadas inmediatamente en el hielo, utilizando tres tubos epedorff de 1.5 ml previamente etiquetados para cada cepa. Estas muestras se colocaron posteriormente a -70 grados C, en un refrigerador REVCO.

Para estar seguros de que las cepas aisladas son Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli, se procedió a inocular frijol con una cepa por electrotipo. Los frijoles inoculados fueron colocados en frascos con medio nutritivo y agar (ver Anexo 1), los frascos con medio fueron previamente esterilizados, mientras que los frijoles fueron lavados con hipoclorito de sodio al 15% y enjuagados varias veces con agua estéril; los frijoles inoculados se dejaron crecer en una camara de germinación Acon durante un mes. Aquellas cepas que no indujeron nodulación en frijol fueron desechadas de la muestra final.

III.-ELECTROFORESIS

Se eligieron dos sistemas de buffer (Anexo 1), con base en el estudio de Piñero et al (1988), para analizar por medio de electroforesis 6 enzimas en la colecta de 1987, y posteriormente 9 loci enzimáticos para la colecta de 1988 (Tabla 2).

TABLA 2

ENZIMAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

| ENZIMAS* | SISTEMA** BUFFER | AÑO |
|----------|---------------------|------------|
| IDH | TRIS PH 8 | 1987, 1988 |
| 6-PGD | TRIS PH 6 | 1987, 1988 |
| MDH | TRIS PH 6 | 1987, 1988 |
| G-6P | TRIS PH 8 | 1987, 1988 |
| HBD | TRIS PH 6 | 1987, 1988 |
| PEP | TRIS PH 8 | 1987, 1988 |
| XDH | TRIS PH 6 | 1988 |
| EST | TRIS PH 8 | 1988 |

* tinciones basadas en Selander et al., 1986 (Ver Anexo 1)

** el uso de estos buffer esta basado en el estudio de Piñero et al (1988).

Se hicieron geles de almidón al 12%, y se siguió la técnica descrita por Selander et al. (1987) para correr las muestras y teñir los geles.

A cada cepa se le asignó un electrotipo (ET) de acuerdo al patrón de bandas que presentó para las enzimas analizadas. Se corrieron al menos tres electroforesis por cepa para estar seguros de su ET.

IV.-ANALISIS DE SUELOS

Se tomó una muestra de suelo de la zona que rodeaba la raíz, para cada planta de donde se extrajeron nódulos. Esta muestra fue introducida inmediatamente a bolsas de plástico donde se etiquetaron y sellaron. Las muestras fueron secadas al aire y pasadas por tamices con malla cada vez mas pequeña hasta llegar a la malla de 0.5 mm con la finalidad de tener partículas pequeñas y homogéneas de suelo.

En el laboratorio de Análisis Químicos del Centro de Ecología UNAM se analizaron estas muestras para determinar su pH, contenido de fósforo, calcio, nitrógeno total y materia orgánica. Para este proceso se siguieron las técnicas descritas por Jackson (1982).

V.-ANALISIS DE DATOS

A) Distribución espacial

1.-Correlación entre distancia genética entre las cepas que

nodulan una planta y la distancia espacial que ocupan estos nódulos dentro de cada planta.

Esta correlación nos dará información sobre si el suelo donde se desarrolla una planta es dinámico, suponiendo que si existe correlación entre ambas variables el suelo es estático ya que todas las bacterias presentes en una planta estarían estrechamente emparentadas.

Con este fin se utilizó la prueba no paramétrica de Mantel (1967 en Manly, 1985). En esta prueba, se comparan dos matrices simétricas de distancias euclidianas. Este análisis fue originalmente diseñado para detectar aglutinaciones en el tiempo y el espacio de enfermedades; mas tarde fué propuesto para estudiar la variación geográfica en poblaciones naturales y mas recientemente para analizar selección natural en poblaciones (Manly, 1985). La ventaja que presenta este análisis sobre el de comparaciones pareadas es que en este existe independencia entre las variables de cada matriz (Dietz, 1983).

Se obtuvo la matriz de distancias para la frecuencia alélica de las cepas por planta y la matriz de las distancias entre nódulos de esa planta. Para conocer la correlación entre ambas matrices se obtiene el estadístico Z

$$Z = \sum_{i,j} m_{ij} e_{ij}$$

Donde:

m_{ij} = elemento de la matriz de distancias M

e_{ij} = elemento de la matriz de distancias E

Z es calculada y comparada con una distribución de Z que es obtenida al tomar los elementos de una matriz de manera aleatoria y comparándolos con la otra matriz. Al repetir este procedimiento muchas veces, utilizando diferentes ordenes aleatorios de la matriz en cada ocasión, se obtienen la distribución de Z aleatorizada.

La idea básica de este análisis es que cuando no existe una relación entre las frecuencias alélicas de las cepas con la distancia de los nódulos, entonces la matriz de distancias de los nódulos de la planta o de los ET's sera igual a la matriz aleatorizada de los nódulos o de los ET's, por lo que la Z observada sera típica de la distribución Z (Manly, 1985).

El programa estadístico que se utilizó para obtener las permutaciones de las matrices de distancia, fue diseñado por Dietz (1983) y esta compilado en MICROSOFT FORTRAN VER. 4.01, en el se obtiene el valor del estadístico de Mantel, Spearman y Kendal así como la significancia de cada uno de ellos. Se realizaron 4000 permutaciones para comparar la matriz de las cepas con la de los

nódulos. Se considera un nivel de significancia de 0.05 para la prueba de Mantel.

2.-Distribución de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli dentro de una raíz.

Cuando un ET se presenta más de una ocasión dentro de una raíz es interesante saber si ésta distribución se debe al azar o a que existe un fenómeno de contagio de este ET dentro de la raíz. Para conocer esto, se utilizó un prueba de "t de student" modificada (Greig-Smith, 1984), donde la "t" es el resultado de la división del promedio de distancias entre nódulos de ET diferente menos el promedio de la distancia de nódulos con ET idéntico sobre el error estandar de la distancia entre nódulos diferentes.

3.-Relación entre las frecuencias alélicas de las cepas de una raíz con los factores del suelo que la rodean y con las variables de la planta donde se encuentra.

Con la finalidad de conocer la relación entre las características de las plantas a las que estan asociadas las cepas y del suelo que se encuentra alrededor de éstas plantas, se utilizó la prueba no paramétrica de Mantel (1967 en: Manly, 1985). Se obtuvo la matriz de distancias para la frecuencia alélica de las cepas por planta y las matrices de los parámetros estandarizados tanto del suelo como de la planta. Estos se estandarizaron de la siguiente manera:

$$\text{Valor estandarizado} = \frac{\bar{X} - x_j}{D.E}$$

Donde:

\bar{X} =Valor promedio del factor a estandarizar

x_j =Valor del factor para la planta jésima

D.E=desviación estandar del factor

La idea básica de este análisis es que cuando no existe una relación entre las frecuencias alélicas de las cepas con la planta o el suelo, entonces la matriz de distancias de la planta o el suelo será igual a la matriz aleatorizada de la planta o el suelo, por lo que la Z observada sera típica de la distribución Z (Manly, 1985).

B)Análisis de la diversidad, dominancia y similitud de las cepas de Rhizobium asociadas a frijol cultivado y silvestre

Como medida de la diversidad ecológica se utilizó el inverso del índice de Simpson (Begon et al., 1986):

$$1/D = 1/\sum (p_i)^2$$

donde:

p_i = abundancia proporcional de la cepa i ésima.

Para determinar la dominancia de ciertos ET's en los diferentes sitios de estudio, se aplicó el índice de Simpson (Begon et al., 1986):

$$D = \sum (p_i)^2$$

Donde:

p_i = frecuencia de la cepa i ésima

Para comparar las diversidades ecológicas de cada sitio se ordenaron en un histograma los ET desde el más abundante hasta el de menor abundancia y se realizó una prueba de χ^2 entre los sitios.

Asimismo se compararon los sitios con el índice de similitud de Sorensen (Krebs, 1978):

$$\text{Similitud} = \frac{2c}{a + b}$$

Donde:

c = número de cepas comunes a ambos sitios

a , b = número de cepas particulares de cada sitio

C) Diversidad genética

La diversidad genética fué analizada a diversos niveles (intranódulo, intraplanta, población) tanto para Rhizobium asociado a frijol silvestre como al que nodula en frijol cultivado, Esta puede expresarse de manera separada para cada enzima (h) o en promedio (H) (Nei, 1978):

$$h = 1 - \sum x^2 (n/n-1)$$

$$H = \sum h / n(\text{loci})$$

Donde:

x = la frecuencia del alelo i ésimo

n = el número de ET's.

h = la diversidad genética por loci

H = la media aritmética de h para los diferentes loci.

Las diversidades genéticas obtenidas para cada año y para cada población fueron comparadas por medio de una prueba de "t de student".

D) Distancia genética y dendrogramas

Otro parámetro importante es el de distancia genética (D) entre los diversos ET. Existen muchas formas estadísticas de obtener índices para distancias genéticas (ver Nei, 1987). Aquí se utilizó es la sugerida por Selander et al (1986):

$$D = \frac{2(\text{num. de loci con alelos diferentes})}{\text{No. alelos } i + \text{No. alelos } j}$$

Donde:

alelos *i*ésimo y *j*ésimo, presentan diferentes movilidades electroferotípicas.

A partir de la matriz de distancias genéticas, se pueden usar numerosos métodos estadísticos que nos ayudan a determinar el parentesco genético entre los ET (ver Nei, 1987); estos incluyen componentes principales, coordenadas principales y "análisis de conglomerados". Dentro de este último grupo de métodos destaca el UPGMA ("un weighted pair-group method with arithmetic mean"), el cual fué desarrollado inicialmente por Sokal y Michener (1958 en: Nei, 1986). Por medio de simulaciones donde se utilizaban datos moleculares (sustitución de nucleótidos) se demostró que cuando las distancias genéticas estimadas están sujetas a errores estocásticos grandes, el UPGMA es mejor que los otros métodos para obtener el árbol filogenético más cercano a l árbol real (Tateno et al., 1982; Nei et al., 1983).

E) Diferenciación entre subpoblacione de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a frijol cultivado y silvestre en Morelos

Se determinó la diferenciación entre subpoblaciones (Gst) (Young et al., 1987) de Rhizobium asociado a frijol común y a frijol ayocote, tanto silvestre como cultivados durante 1988.

$$Gst = \frac{Ht - Hs}{Ht}$$

Donde:

Ht=diversidad genética total

Hs=promedio de la diversidad genética de las subpoblaciones a comparar

RESULTADOS

I.-ECOLOGIA

A) Análisis de suelos

En 1988 se obtuvieron muestras de suelos para los dos sitios de Phaseolus vulgaris L., silvestre y cultivado, los resultados de los análisis de suelo se muestran en las tablas 3 y 4 respectivamente.

TABLA 3

ANALISIS DE SUELO PARA EL SITIO DE Phaseolus vulgaris SILVESTRE DURANTE 1988

| MUESTRA | % HUMEDAD | pH | %MATERIA ORGANICA | CALCIO (PPM) | NITROGENO TOTAL (PPM) | FOSFORO (PPM) |
|----------|-----------|------|-------------------|--------------|-----------------------|---------------|
| 1 | 20.81 | 6.32 | 17.59 | 26.98 | 14993 | 2120 |
| 2 | 34.40 | 5.90 | 16.56 | 33.72 | 13273 | 1605 |
| 3 | 23.90 | 5.85 | 6.90 | 42.71 | 9408 | 2103 |
| 4 | 31.50 | 5.85 | 18.28 | 30.35 | 13273 | 1585 |
| 5 | 28.20 | 6.05 | 8.26 | 21.36 | 8548 | 2078 |
| 6 | 37.80 | 6.00 | 14.14 | 46.08 | 11985 | 2078 |
| 7 | 19.80 | 6.20 | 8.97 | 28.01 | 8118 | 2070 |
| 8 | 27.40 | 5.95 | 9.32 | 26.98 | 8118 | 2063 |
| 9 | 28.20 | 6.15 | 20.35 | 24.73 | 11555 | 2575 |
| 10 | 31.25 | 6.00 | 18.24 | 25.46 | 10265 | 5626 |
| 11 | 30.00 | 6.25 | 15.18 | 24.73 | 12885 | 2038 |
| 12 | 29.57 | 5.98 | 18.36 | 23.98 | 10958 | 1987 |
| 13 | 26.12 | 5.92 | 22.77 | 51.15 | 12786 | 2057 |
| 14 | 32.60 | 5.98 | 15.18 | 24.73 | 12145 | 1478 |
| 15 | 27.45 | 6.14 | 17.25 | 19.11 | 11125 | 1468 |
| 16 | 24.54 | 5.94 | 12.42 | 17.89 | 16280 | 1458 |
| 17 | 31.20 | 5.98 | 22.08 | 16.86 | 10265 | 1445 |
| 18 | 34.68 | 6.08 | 20.70 | 37.09 | 12415 | 1435 |
| 19 | 9.09 | 6.12 | 22.08 | 22.08 | 10695 | 1415 |
| 20 | 35.65 | 5.89 | 13.80 | 39.34 | 16280 | 1405 |
| 21 | 28.40 | 6.11 | 10.35 | 25.98 | 14133 | 1498 |
| 22 | 24.80 | 6.09 | 10.35 | 40.46 | 12415 | 1383 |
| 23 | 23.60 | 6.00 | 13.80 | 41.59 | 7688 | 1393 |
| PROMEDIO | 26.97 | 6.05 | 14.96 | 27.57 | 11674 | 1687 |
| +/-D.E | 6.9 | 0.13 | 4.77 | 1.73 | 2496 | 343 |

TABLA 4

ANALISIS DE SUELO PARA EL SITIO DE Phaseolus vulgaris CULTIVADO, DURANTE 1988

| MUESTRA | %HUMEDAD | pH | %MATERIA ORGANICA | CALCIO (PPM) | NITROGENO TOTAL (PPM) | FOSFORO (PPM) |
|----------------|----------|-------|-------------------|--------------|-----------------------|---------------|
| 1 | 14.31 | 5.10 | 1.65 | 113.36 | 895 | 3567 |
| 2 | 27.90 | 5.30 | 1.41 | 156.96 | 901 | 3663 |
| 3 | 16.70 | 5.26 | 1.79 | 191.84 | 1069 | 3377 |
| 4 | 25.00 | 5.45 | 1.98 | 122.08 | 816 | 3667 |
| 5 | 21.70 | 6.10 | 1.31 | 139.52 | 900 | 3572 |
| 6 | 31.10 | 5.80 | 1.90 | 130.80 | 815 | 3573 |
| 7 | 13.30 | 5.61 | 1.33 | 148.24 | 899 | 3671 |
| 8 | 20.90 | 5.70 | 1.23 | 122.08 | 561 | 3379 |
| 9 | 21.70 | 6.01 | 1.52 | 139.52 | 1237 | 3183 |
| 10 | 23.50 | 5.40 | 1.50 | 174.40 | 983 | 3281 |
| 11 | 7.45 | 5.36 | 1.16 | 130.80 | 998 | 3579 |
| 12 | 19.62 | 5.78 | 1.85 | 104.64 | 1067 | 3480 |
| 13 | 26.10 | 5.83 | 1.37 | 104.64 | 982 | 3681 |
| 14 | 20.95 | 5.26 | 1.43 | 139.52 | 985 | 3482 |
| 15 | 18.10 | 5.36 | 1.46 | 148.24 | 982 | 3483 |
| 16 | 24.70 | 5.47 | 1.26 | 156.96 | 897 | 3585 |
| 17 | 28.18 | 5.90 | 1.12 | 148.24 | 1601 | 4195 |
| 18 | 2.59 | 5.21 | 1.34 | 130.80 | 1081 | 2874 |
| 19 | 29.15 | 5.60 | 1.18 | 139.52 | 1661 | 4202 |
| 20 | 21.90 | 5.80 | 2.04 | 139.52 | 1130 | 3898 |
| 21 | 18.30 | 5.46 | 1.56 | 235.44 | 725 | 354 |
| 22 | 17.10 | 5.34 | 1.90 | 104.64 | 980 | 3696 |
| 23 | 20.95 | 5.16 | 1.39 | 139.52 | 895 | 3697 |
| 24 | 19.62 | 5.26 | 1.42 | 130.80 | 894 | 3596 |
| 25 | 23.89 | 5.98 | 1.56 | 132.56 | 987 | 3698 |
| 26 | 31.10 | 5.50 | 1.73 | 130.97 | 876 | 3358 |
| 27 | 28.18 | 5.60 | 1.24 | 165.68 | 1064 | 3493 |
| 28 | 20.90 | 5.70 | 1.87 | 113.36 | 893 | 3599 |
| 29 | 16.90 | 5.40 | 1.45 | 174.40 | 1074 | 3599 |
| 30 | 19.62 | 5.90 | 1.75 | 156.96 | 1135 | 3602 |
| PROMEDIO | 20.84 | 5.53 | 1.52 | 140.14 | 996 | 3469 |
| +/-D.E | 6.40 | 0.26 | 0.23 | 38.0 | 214 | 620 |
| t ENTRE SITIOS | 1.13N.S | 8.66* | 10.2* | 13.09* | 19.10* | 9.83* |
| | | +silv | +silv | +cult | +silv | +cult |

+silv: existe mayor cantidad en el sitio silvestre.
+cult: existe mayor cantidad en el sitio cultivado.
*p > 0.005
N.S. no significativo

Por medio de una prueba de "t" se encontró (Tabla 5) que, en el sitio de frijol cultivado hubo menos materia orgánica y menos nitrógeno total que el sitio de frijol silvestre. Asimismo, en la parcela cultivada hubo en promedio más calcio y más fósforo que el sitio de frijol silvestre. También se observó que el pH fué más ácido en el sitio de frijol cultivado.

B) Descripción de la abundancia de las diversas cepas de Rhizobium en los sitios de estudio.

1.-Frijol común cultivado

Durante 1987 se aislaron un total 299 cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociadas a frijol común cultivado: 51 de plantas diferentes, 28 cepas dentro de una planta y 220 intranódulo. En la tabla 5 se presentan los electrotipos por enzima aislados a partir de las cepas colectadas durante 1987. Dentro de estas cepas sólo dos electrotipos (ET) se presentaron más de 5 veces, representando estos cerca del 59% de todas las cepas, mientras el 19.3% de las cepas se presentaron solamente una vez (Tabla 6).

En 1988 se obtuvieron 198 cepas de R. leguminosarum biovar phaseoli a partir de 385 nódulos de 32 plantas de P. vulgaris cultivado. De estas, 180 cepas presentaron actividad en 9 loci enzimáticos. Estas cepas se aglutinaron en 66 ET's diferentes (Tabla 7). El 51.3% de los ET se presentaron 5 veces o más, mientras que el 15.8 % de las cepas se presentaron una sola vez. Dentro de estos ET, 7 son comunes a la colecta de 1987. Los 3 ET más comunes de 1988 fueron también abundantes en 1987 (Tabla 8)

2.-Frijol común silvestre

Para el año de 1987 en la población de frijol silvestre se obtuvieron solamente 16 cepas de nódulos diferentes, 12 de plantas diferentes y 4 dentro de una planta, así como 220 colonias intranódulo. En este año sólo se obtuvieron 3 ET's diferentes (Tabla 9) en toda la población siendo el ET 3 el más abundante (56%) (Tabla 10).

Durante 1988 se muestrearon 42 plantas de Phaseolus vulgaris silvestre de las cuales 22 presentaron nódulos; de estas se obtuvieron 123 nódulos; de los cuales se lograron aislar 33 cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli que se aglutinan en 8 ET's (Tabla 9). Dentro de estos, uno de ellos es común al cultivar de 1988 y otro representa por sí sólo el 63.6% de la población (Tabla 10).

3.-Frijol ayocote silvestre y cultivado

Durante 1988, en la población de P. coccineus L. spp. coccineus cultivado de Tepoztlán se muestrearon 6 plantas

obteniéndose 15 cepas que se agruparon en 4 ET. En la población de P. coccineus spp. formosus L. silvestre de Tepoztlán se extrajeron 8 plantas de las que se aislaron 15 cepas que se agrupan en 10 ET, mientras que en el sitio de P. coccineus L. spp. formosus de Nepoalco se analizaron 9 plantas de las que se purificaron 20 cepas que se agrupan en 17 ET (Tabla 11). Dentro de las cepas asociadas a frijol ayocote cultivado, se observa que los dos ET más abundantes son comunes a los ET encontrados en la parcela cultivada de P. vulgaris (Tabla 8). En la Tabla 12 se muestra la distribución de la abundancia de los ET observados en los sitios de frijol ayocote silvestre.

TABLA 5

ELECTROTIPOS POR ENZIMA PARA Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris CULTIVADO EN SANTIAGO TEPETLAPA, MORELOS, EN 1987

| ENZIMAS | | | | | | ET | PLANTAS EN LAS QUE NODULARON |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|
| IDH | 6PG | MDH | G6P | HBD | PEP | | |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 4 | 42 |
| 1.0 | 2.0 | 0.5 | - | 1.0 | 1.0 | 5 | 58 |
| 1.0 | 3.0 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 6 | 80 |
| 1.0 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 7 | 60,29 |
| 1.0 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 8 | 24,47 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.5 | 9 | 52 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 10 | 19,18,32,26, 43,91,89 |
| 1.5 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 11 | 97 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 12 | 88,73,92,6,56,53, 5,74,82,49,64,9,50 |
| 3.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | - | 13 | 68 |
| 3.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 14 | 15 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 15 | 35 |
| 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 16 | 62 |
| 1.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 17 | 75 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 18 | 67 |
| 1.0 | 2.5 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 19 | 66,11,59,39 |
| 1.0 | 3.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 20 | 87 |
| 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 21 | 37 |
| 1.0 | 2.5 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 22 | 30,81,65 |
| 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 23 | 54 |
| 1.0 | 1.5 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | - | 24 | 28,1 |
| 1.0 | 2.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | 25 | 34 |

continuación de la tabla 5

| ENZIMAS | | | | | | ET | PLANTAS EN LAS QUE NODULARON |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|----|---------------------------------|
| IDH | 6PG | MDH | G6P | HBD | PEP | | |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 26 | 31 |
| 1.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 27 | 2 |
| 1.0 | 4.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | - | 28 | 2 |
| 1.0 | 4.0 | 1.0 | 4.0 | 1.0 | - | 30 | 2 |
| 1.0 | 2.5 | 1.0 | 4.0 | 1.5 | - | 32 | 2 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | - | 33 | 2 |
| 3.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | 34 | 2 |

TABLA 6

ABUNDANCIA DE LOS ELECTROTIPOS MAS COMUNES DE Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris CULTIVADO EN 1987.

| ELECTROTIPOS MAS ABUNDANTES EN 1987 | | |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| ET | NUMERO DE CEPAS | PORCENTAJE EN LA POBLACION |
| 15 | 1 | 1.2 |
| 12 | 13 | 23.5 |
| 10 | 18 | 35.2 |
| 13 | 2 | 2.4 |
| 8 | 2 | 2.4 |
| 22 | 3 | 3.6 |
| 26 | 1 | 1.2 |
| 9 | 2 | 2.4 |
| 19 | 4 | 7.8 |
| TOTAL | 46 | 79.7 |

TABLA 7

ELECTROTIPOS POR ENZIMA PARA *Rhizobium leguminosarum* BIOVAR *phaseoli* ASOCIADO A *Phaseolus vulgaris* CULTIVADO EN SANTIAGO TEPETLAPA, EN 1988.

| ENZIMAS | | | | | | | | | ET | PLANTAS EN LAS QUE MODULAN |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|------------------------------------|
| IDH | 6PG | MDH | G6P | HBD | PEP | XDH | EST1 | EST2 | | |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 15a | 1,5,6,8,12,13 15,23,25,26,30 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 15b | 1,2,6,8,9,11,12, 14,19,23,25,30 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 26 | 2,9,13 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 39 | 2,3,7,8,19,23 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 40 | 2,21,27,29,30 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 41 | 2,21 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 10a | 2,14,18,22,29 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 12 | 2,12,19a,23, 24,25,28,29 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 42 | 2 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 43 | 2 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 44 | 3 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 45 | 3,10 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 10b | 3,6,22 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 46 | 3,26 |
| 1.0 | 3.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 22 | 3 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 47 | 3,8 |
| 1.0 | 1.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 48 | 3 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 10c | 3,8,11,23,29 |
| 1.0 | - | 1.0 | 2.0 | 0.5 | 2.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 53 | 6 |
| 1.0 | - | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 54 | 7 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 49* | 4 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | - | 1.0 | 1.0 | 50 | 7,12 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 51 | 6,12,24,30 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 56 | 7,14 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 52 | 6 |
| 1.0 | 1.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 80 | 21 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 57 | 7 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 74 | 16,19 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | - | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 18 | 10 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 58 | 7,13 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 59 | 9,21,30 |

continuación Tabla 7

| ENZIMAS | | | | | | | | | ET | PLANTAS EN LAS QUE MODULAN |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-------------------------------|
| IDH | 6PG | MDH | G6P | HBD | PEP | XDH | EST1 | EST2 | | |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 60 | 6 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 64 | 12,14,19a,22, 23,28,29 |
| 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | - | 1.0 | 1.0 | 55 | 7 |
| 1.0 | 5.0 | 1.0 | - | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 68 | 14 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | - | 1.0 | 1.0 | 65 | 18 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 19 | 14,25 |
| 1.0 | 5.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 66 | 14 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 3.0 | 1.0 | 10d | 6,16 |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 69 | 15 |
| 0.5 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 70 | 15 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 61 | 7,9 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 62 | 11,12 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 71 | 15 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 72 | 15 |
| 1.0 | 5.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 63 | 11,23 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 82 | 21 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 73 | 16 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 3.0 | 1.0 | 75 | 16 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 10e | 6,16 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 81 | 21 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 3.0 | 76 | 19 |
| 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 77 | 19 |
| 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | - | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 67 | 14 |
| 1.0 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 78 | 21 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 0.5 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 79 | 21 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 83 | 22 |
| 1.0 | 5.0 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 84 | 22,24 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 85 | 23 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 86 | 23 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 87* | 23 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 88 | 25 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 89 | 26 |
| 1.0 | 5.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 90 | 27 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 91 | 28 |

* Cepas que no nodularon en presencia de Phaseolus vulgaris

TABLA 8

ABUNDANCIA DE LOS ELECTROTIPOS MAS COMUNES DE Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris Y A P.coccineus coccineus CULTIVADO EN 1988.

| <u>P.vulgaris</u> | | | <u>P.coccineus</u> | | |
|-------------------|-----------------|-------------|--------------------|-----------------|-------------|
| ET | NUMERO DE CEPAS | % POBLACION | ET | NUMERO DE CEPAS | % POBLACION |
| C 15 | 20 | 11.2 | V 39 | 11 | 73.3 |
| * 15a | 15 | 8.3 | V 15 | 2 | 13.3 |
| C 12 | 11 | 6.1 | 100 | 1 | 6.6 |
| 10 | 10 | 5.6 | 101 | 1 | 6.6 |
| C 10a | 8 | 4.4 | | | |
| 39 | 8 | 4.4 | | | |
| 64 | 8 | 4.4 | | | |
| 51 | 7 | 3.8 | | | |
| 26 | 5 | 2.8 | | | |
| 40 | 5 | 2.8 | | | |
| C 19 | 1 | 0.5 | | | |
| TOTAL | 98 | 54.2 ** | | 15 | 100 |

C Electrotipos comunes a los dos años de estudio.

V Electrotipos comunes a P.vulgaris cultivado

* Debido a que en la colecta de 1987 sólo se usaron 6 loci y en 1988 se utilizaron 9, existen varios ET's de 1988 diferentes dentro de un ET de 1987.

** El resto de los ET se presentan menos de 5 veces, por lo que se consideran poco abundantes.

TABLA 9

ELECTROTIPOS POR ENZIMA PARA Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris SILVESTRE EN TEPOZTLAN, EN 1987 Y 1988.

| ELECTROTIPO POR ENZIMA PARA 1987 | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|----|-----------------------------------|
| ENZIMAS | | | | | ET | PLANTAS EN LAS QUE NODULARON |
| IDH | 6PG | MDH | G6P | HBD | | |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1 | 17,4,13 |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 2 | 5,6,9,11,12 |
| 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3 | 13,14,16, 17,18,20,22,23 24,25 |

continuación tabla 9

ELECTROTIPO POR ENZIMA PARA 1988

| ENZIMAS | | | | | | | | | ET | PLANTAS EN LAS QUE NODULARPON |
|---------|-------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-------------------------------|
| IDH | 6-PGD | MDH | G-6P | HBD | PEP | XDH | EST1 | EST2 | | |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 92 | 2,3,4,6,13,14,16,18,22 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 82* | 8,9,22 |
| 1.0 | 5.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 93 | 7,13 |
| 1.0 | 4.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 94 | 9 |
| 1.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 95 | 6,13 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 96 | 12,18 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 97 | 14 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 0.5 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 98 | 16 |

* ET común al sitio de P.vulgaris cultivado

TABLA 10

ABUNDANCIA DE ELECTROTIPOS DE Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris SILVESTRE .

| ELECTROTIPOS DE 1988 | | | ELECTROTIPOS DE 1987 | | |
|----------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------|------------------|
| ET | NUMERO DE CEPAS | % POBLACION 1988 | ET | NUMERO DE CEPAS | % POBLACION 1987 |
| 92 | 21 | 63.6 | 1 | 2 | 12.5 |
| 82 | 4 | 12.1* | 2 | 5 | 31.2 |
| 93 | 2 | 6.06 | 3 | 9 | 56.2 |
| 94 | 2 | 6.06 | | | |
| 95 | 1 | 3.03 | | | |
| 96 | 1 | 3.03 | | | |
| 97 | 1 | 3.03 | | | |
| 98 | 1 | 3.03 | | | |
| TOTAL | 33 | 100 | | 16 | 100 |

* Electrotipo común a R.leguminosarum asociado a frijol cultivado

TABLA 11

ELECTROTIPOS POR ENZIMA PARA Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A Phaseolus coccineus EN TRES LOCALIDADES DEL ESTADO DE MORELOS

| ENZIMA | | | | | | | | | ET | PLANTA EN LA QUE NODULAN |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|--------------------------|
| IDH | 6PG | MDG | G6P | HBD | PEP | XDH | EST1 | EST2 | | |
| Sitio de <u>P. coccineus</u> cultivado | | | | | | | | | | |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 39* | 1,5,7,8,2,4,3 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 100 | 9 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 15* | 2,1 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 101 | 2 |

Sitio de P. coccineus silvestre, Tepoztlán

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 102 | 1 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 103 | 9,3,5,2 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 104 | 9 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 105 | 4 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 4.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 106 | 3 |
| 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 107 | 3 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | - | 108 | 9 |
| 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | - | 109 | 8 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 3.0 | 0.5 | 1.0 | - | 110 | 8 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 3.0 | 0.5 | 2.0 | - | 111 | 4 |

Sitio de P. coccineus silvestre, Nepoalco

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 112 | 17 |
| 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | - | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 113 | 8 |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 114 | 8 |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 115 | 8 |
| 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 116 | 8 |
| 2.0 | 0.5 | 3.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 117 | 8 |
| 2.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 118 | 5 |
| 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 119 | 9 |
| 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 4* | 6 |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 120 | 5,1 |
| 2.0 | 1.0 | 1.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 121 | 4 |
| 2.0 | 4.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 122 | 4 |
| 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 123 | 4 |
| 2.0 | 1.5 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 124 | 4 |
| 2.0 | - | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 125 | 1 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 50* | 2 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 52* | 3 |

*ET común con los asociados a P. vulgaris cultivado

TABLA 12

ABUNDANCIA DE ELECTROTIPOS DE Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A Phaseolus coccineus spp. formosus SILVESTRE EN DOS SITIOS DE MORELOS.

| SITIO DE TEPOZTLAN | | | SITIO DE NEPOPOALCO | | |
|--------------------|-----------------|-------------|---------------------|-----------------|-------------|
| ET | NUMERO DE CEPAS | % POBLACION | ET | NUMERO DE CEPAS | % POBLACION |
| 102 | 1 | 6.6 | 112 | 1 | 5 |
| 103 | 5 | 33.3 | 113 | 1 | 5 |
| 104 | 1 | 6.6 | 114 | 1 | 5 |
| 105 | 2 | 13.3 | 115 | 1 | 5 |
| 106 | 1 | 6.6 | 116 | 1 | 5 |
| 107 | 1 | 6.6 | 117 | 1 | 5 |
| 108 | 1 | 6.6 | 118 | 1 | 5 |
| 109 | 1 | 6.6 | 119 | 1 | 5 |
| 110 | 1 | 6.6 | 4* | 1 | 5 |
| 111 | 1 | 6.6 | 120 | 2 | 10 |
| | | | 121 | 1 | 5 |
| | | | 122 | 1 | 5 |
| | | | 123 | 2 | 10 |
| | | | 124 | 2 | 10 |
| | | | 125 | 1 | 5 |
| | | | 50* | 1 | 5 |
| | | | 52* | 1 | 5 |
| TOTAL | 15 | 100 | | 20 | 100 |

* Común a P.vulgaris cultivado

C) Distribución espacial de Rhizobium asociado a P.vulgaris cultivado y silvestre.

En las plantas de frijol común se realizaron dos pruebas distintas; la primera determina si el suelo que rodea a las raíces dinámico y la segunda analiza el contagio entre los nódulos vecinos.

Para cada planta de frijol cultivado de 1988 con 8 o más nódulos se compararon la distancia espacial entre los nódulos con las distancias genéticas obtenidas por medio del dendrograma de Nei, con este fin se utilizó la prueba de Mantel, observándose sólo un caso con una correlación positiva significativa entre ambas variables (Tabla 13). En los casos donde había dos o más cepas iguales dentro de una raíz se analizó si éstas se encontraban agregadas o distribuidas al azar, por medio de una prueba de "t" modificada. En varias ocasiones éstas se presentan

de manera significativamente agregada (Tabla 14).

TABLA 13

RELACION ENTRE LAS DISTANCIAS GENETICAS DE Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli Y DISTANCIA ESPACIAL DE LOS NODULOS DENTRO DE UNA RAIZ DE Phaseolus vulgaris CULTIVADO (1988)

| PLANTA | VALORES DE SIGNIFICANCIA PARA LAS PRUEBAS DE SPEARMAN | MANTEL | KENDAL |
|--------|---|--------|--------|
| 2 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| 3 | 0.745 | 0.756 | 0.642 |
| 6 | 0.234 | 0.143 | 0.272 |
| 7 | 0.654 | 0.388 | 0.728 |
| 8 | 0.426 | 0.553 | 0.365 |
| 12 | 0.445 | 0.420 | 0.630 |
| 14 | 0.987 | 0.997 | 0.963 |
| 19 | 0.907 | 0.878 | 0.909 |
| 21 | 0.277 | 0.200 | 0.330 |
| 30 | 0.951 | 0.959 | 0.917 |

TABLA 14

RAICES DE Phaseolus vulgaris CULTIVADO CUYOS NODULOS PRESENTAN ET'S AGREGADOS DE R. leguminosarum biovar phaseoli (1988)

| PLANTA | ET | "t" | GRADOS DE LIBERTAD | SIGNIFICANCIA |
|--------|------|------|--------------------|---------------|
| 2 | 10 | 5.16 | 7 | P<0.001 |
| | 26 | 3.59 | 7 | P<0.01 |
| 6 | 15 | 2.45 | 7 | P<0.05 |
| | 10'' | 2.72 | 11 | P<0.05 |
| 12 | 15' | 7.69 | 9 | P<0.001 |
| 23 | 39 | 6.31 | 10 | P<0.001 |
| | 64 | 4.70 | 10 | P<0.01 |
| | 15' | 2.82 | 10 | P<0.02 |
| 30 | 15 | 3.42 | 8 | P<0.01 |

A nivel poblacional se exploró nuevamente por medio de la prueba de Mantel la correlación entre las cepas de cada planta con el medio ambiente donde se encontraban se consideraron los parámetros de la planta como la altura, el diámetro, el número de hojas, de flores y de frutos, así como los nutrientes del suelo que rodean a la raíz. Se observó que la matriz de distancias genéticas de las cepas aisladas por planta no se correlacionan de

manera significativa con la matriz de distancias para los valores estandarizados de ninguno de los parámetros considerados. Por otro lado, la matriz del suelo se encontró significativamente correlacionada con la matriz de las plantas (Tabla 15).

TABLA 15

ANALISIS DE MANTEL ENTRE LA DISTANCIA GENETICA DE LAS CEPAS DE R. leguminosarum CON LOS VALORES ESTANDARIZADOS DE LA PLANTA DONDE NODULAN Y DEL SUELO DONDE SE ENCUENTRAN (en la parcela de frijol común cultivado durante 1988)

| VALOR DE SIGNIFICANCIA | | | | |
|------------------------|----------|------|--------|--------|
| | ANALISIS | CEPA | PLANTA | SUELO |
| CEPA | SPEARMAN | - | 0.801 | 0.933 |
| | MANTEL | | 0.108 | 0.256 |
| | KENDALL | | 0.745 | 0.970 |
| PLANTA | SPEARMAN | | - | 0.046* |
| | MANTEL | | | 0.050* |
| | KENDALL | | | 0.013* |

* SIGNIFICATIVO (P < 0.05)

D) Patrones de diversidad, dominancia y similitud en Rhizobium asociado a frijol cultivado y silvestre en Morelos

Debido a que se ha reportado que Rhizobium presenta tasas de recombinación muy bajas en el campo, que indican una estructura clonal (Young, 1985; Young et al., 1987; Piñero et al., 1988), para poder comparar los sitios de estudio se utilizaron índices que normalmente se utilizan para cuantificar la diversidad de especies dentro de las comunidades biológicas. En este estudio se encontró que en el sitio de frijol común cultivado existe una diversidad mayor y una menor dominancia que en el sitio de P. vulgaris silvestre (Tabla 16). Mientras que en el caso de las poblaciones asociadas a P. coccineus ocurre lo contrario, ya que el sitio menos diverso es el de frijol ayocote cultivado y el más diverso es el de frijol ayocote silvestre de Nepoalco (Tabla 16).

TABLA 16

ANALISIS COMPARATIVO DE LA DIVERSIDAD ECOLOGICA Y LA DOMINANCIA EN LAS POBLACIONES DE Rhizobium ESTUDIADAS DURANTE 1988.

| INDICE | POBLACION DE <u>Phaseolus</u> | | | | |
|-----------|-------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| | CULTIVADA | | SILVESTRE | | |
| | <u>vulgaris</u> | <u>coccineus</u> | <u>vulgaris</u> | <u>coccineus</u> (T) | <u>coccineus</u> (N) |
| SIMPSON | 0.035 | 0.62 | 0.431 | 0.16 | 0.06 |
| 1/SIMPSON | 28.12 | 1.60 | 2.31 | 6.08 | 16.02 |

Si comparamos las distribuciones de los electrotipos para cada sitio por medio de una prueba de χ^2 se encontró que las poblaciones asociadas al frijol común son significativamente distintas entre si y con todas las demás poblaciones (Tabla 17), mientras que los tres poblaciones asociadas al frijol ayocote presentan distribuciones muy semejantes de su diversidad.

TABLA 17

DIFERENCIAS ENTRE LAS DISTRIBUCIONES DE LA DIVERSIDAD EN LAS POBLACIONES DE Rhizobium ESTUDIADAS DURANTE 1988

| | CULTIVADAS | | SILVESTRES | | |
|-------|------------------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | VULG. | COCC. | VULG. | COCC. (T) | COCC. (N) |
| CULTI | VULG. - | 10465.9 | 9094.8 | 14563.2 | 13756.9 |
| VADA | COCC. <0.005 | - | 15.1 | 13.5 | 14.2 |
| SIL | VULG. <0.005 | <0.05 | - | 20.7 | 25.3 |
| VES | COCC. (T) <0.005 | <0.1 N.S. | <0.05 | - | 12.5 |
| TRE | COCC. (N) <0.005 | <0.1 N.S. | <0.05 | 0.7 N.S | - |

VULG. =P.vulgaris

COCC. =P.coccineus

(T) =sitio de Tepoztlán

(N) =sitio de Nepoalco

N.S. =no significativo

la diagonal superior presenta los valores de χ^2 mientras que la diagonal inferior presenta los valores de significancia.

Asimismo se observó que entre las 2 poblaciones asociadas a frijol común existe una similitud de 0.027 ya que comparten una cepa, mientras que las 3 poblaciones asociadas a frijol ayocote no comparten ninguna cepa entre si (similitud de 0). Las dos

0.028 a pesar de que se trata de dos especies diferentes de frijol.

II.-GENETICA DE POBLACIONES

A) Diversidad genética en los diferentes niveles de organización de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* asociado a *P.vulgaris*

1) Intranódulo

En 1987 se encontró un sólo electrotipo de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por nódulo tanto de *P.vulgaris* cultivado como de silvestre, por lo que un nódulo representa muy poco de la diversidad total del sitio.

2) Intraplanta

A partir de los datos electroforéticos obtenidos durante 1988 (Tablas 5, 7 y 9) se observó que la mayor parte de las raíces tienen una H menor a la poblacional tanto en rizobios asociados a frijol común cultivado como a frijol común silvestre (Figuras 5 y 6). Si consideramos qué porcentaje de la diversidad genética total representada en los nodulos de una planta promedio de frijol común cultivado encontramos que ésta es del 72% mientras que en una planta de frijol común silvestre es del 33%, siendo por lo tanto la jerarquización de la diversidad más fuerte es la población de *P.vulgaris* silvestre.

3) Poblacional

La diversidad genética observada en las dos poblaciones de *Rhizobium* asociadas a *P.vulgaris* difiere de un año a otro. En la población cultivada un año representa el 74% de la diversidad total del sitio, mientras que en el sitio silvestre un año representa sólo el 56% de la variación total del sitio,

Por otra parte, todos los loci estudiados fueron polimórficos. En *Rhizobium* asociado a frijol común cultivado la diversidad genética por locus va desde 0.727 en la enzima 6-PGD hasta 0.01 en la EST2 (Tabla 18).

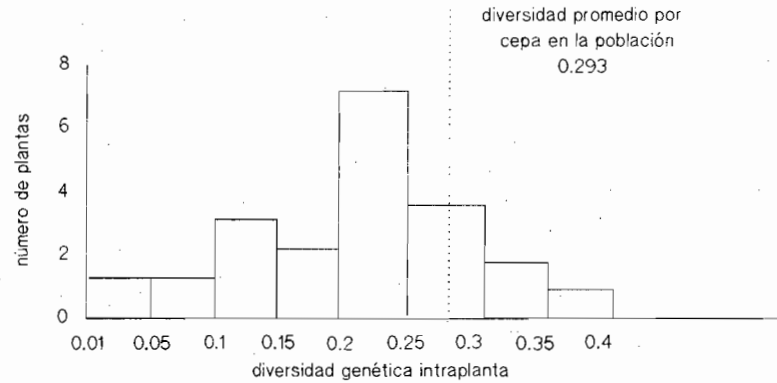


Figura 5: Distribución de la diversidad genética promedio intraplanta en el sitio de frijol común cultivado en Santiago Tepetlapa, Morelos (1988)

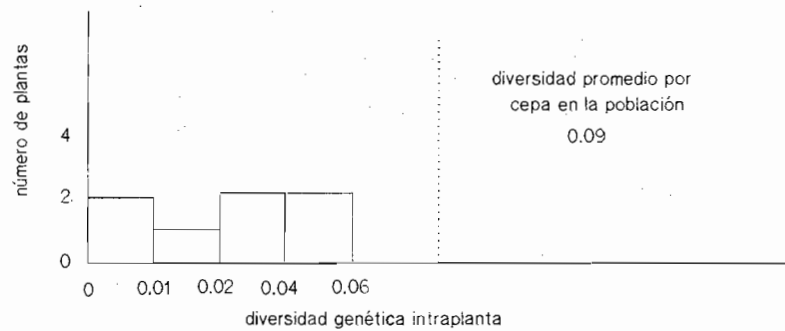


Figura 6: Distribución de la diversidad genética promedio intraplanta en el sitio de frijol común silvestre en Tepoztlán, Morelos (1988)

TABLA 18

DIVERSIDAD GENETICA POR LOCUS PARA LOS ELECTROTIPOS DE Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris CULTIVADO EN SANTIAGO TEPETLAPA, MORELOS; DURANTE 1987 Y 1988

| ENZIMA | FRECUENCIAS ALELICAS | | | | | | h | h |
|--------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1988 | 1987 |
| IDH | 0.955 (0.74) | 0.043 (0.19) | 0.01 (0.05) | | | | 0.08 | 0.496 |
| 5-PGD | 0.343 (0.43) | 0.331 (0.03) | 0.121 (0.37) | 0.07 (0.13) | 0.015 (0.019) | 0.015 | 0.747 | 0.761 |
| MDH | 0.957 (0.03) | 0.015 (0.84) | 0.015 (0.04) | 0.015 (0.08) | | | 0.08 | 0.370 |
| G-6PD | 0.409 (0.22) | 0.469 (0.45) | 0.07 (0.32) | 0.03 | | | 0.606 | 0.610 |
| HBD | 0.842 (0.98) | 0.075 (0.02) | 0.04 | 0.015 | 0.015 | | 0.727 | 0.218 |
| PEP | 0.409 (0.05) | 0.363 (0.11) | 0.121 (0.72) | 0.107 (0.11) | | | 0.671 | 0.540 |
| XDH | 0.717 | 0.181 | 0.093 | 0.015 | | | 0.492 | - |
| EST1 | 0.867 | 0.015 | 0.121 | | | | 0.243 | - |
| EST2 | 0.984 | 0.015 | | | | | 0.02 | - |
| PROMEDIO | | | | | | | 0.407 | 0.499 |
| t de student | | | | | | | 5.06 | N.S. |

() frecuencia alélica de 1987.

N.S. no significativo

En 1988 se encontró una diversidad por ET de 0.407 (tabla 18) la cual es menor a la obtenida por ET durante 1987 (H=0.499), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Si consideramos durante 1988 sólo las 6 enzimas utilizadas durante 1987, encontramos que la H se incrementa a 0.485, que es muy similar ($p > 0.1$) al promedio encontrado en 1987.

Con los datos de las tablas 5 y 7 se construyeron los dendrogramas que nos indican las relaciones genéticas entre organismos. En éste dendrograma (Figura 7) los ET exclusivos a la colecta de 1988 forman 5 grupos bastante heterogéneos entre sí, siendo uno de ellos bastante parecido a los ET exclusivos a 1987. Asimismo, los ET comunes a los dos años de estudio se encuentran insertados en medio de los exclusivos de 1988, al igual que algunos ET's exclusivos de 1987. Dos de los electrotipos (49 y 85) no nodularon. En la Tabla 19 se observa que la diversidad genética por ET, para la población de Rhizobium asociado a frijol silvestre (datos electroforéticos en la tabla 9) es menor que la encontrada en la población asociada a frijol común cultivado

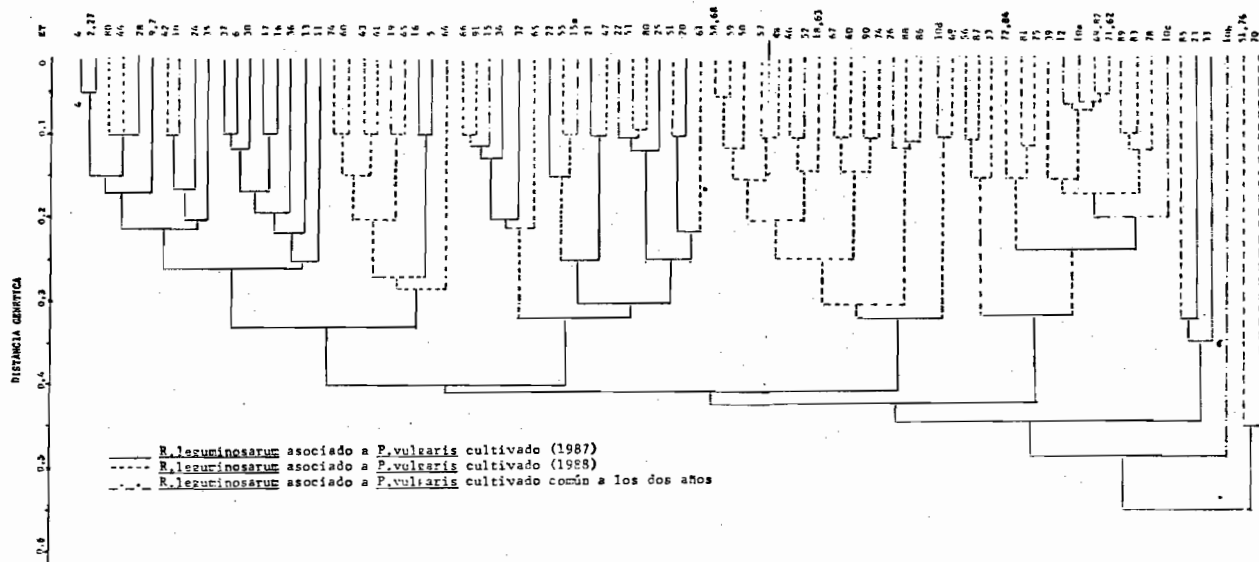


Figura 7: Dendrograma de Nei donde se muestran las distancias genéticas entre los ET de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* asociado a *Phaseolus vulgaris* cultivado, durante 1987 y 1988 en Santiago Tepetlapa, Morelos.

asimismo, se observaron solamente 3 loci polimórficos en las 9 enzimas analizadas

TABLA 19

DIVERSIDAD GENETICA POR LOCUS PARA ELECTROTIPOS DE Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A Phaseolus vulgaris SILVESTRE EN TEPOZTLAN MORELOS DURANTE 1987 Y 1988.

| ENZIMA | FRECUENCIAS ALELICAS | | | | | h | h |
|--------------|----------------------|-----------------|--------|-------|---|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1988 | 1987 |
| IDH | 1 (1) | | | | | 0 | 0 |
| 6-PGD | 0.250 (0.36) | 0.376 (0.63) | 0.257 | 0.121 | | 0.70 | 0.66 |
| MDH | 1 (1) | | | | | 0 | 0 |
| G-6PD | 0.624 (1) | 0.251 | 0.125 | | | 0.48 | 0 |
| HBD | | 1 (0.79) | (0.21) | | | 0 | 0.42 |
| PEP | 0.875 | 0.125 | | | | 0.11 | - |
| XDH | | 1 | | | | 0 | - |
| EST1 | 1 | | | | | 0 | - |
| EST2 | 1 | | | | | 0 | - |
| PROMEDIO | | | | | | 0.118 | 0.216 |
| t de student | | | | | | | 8.56* |

() frecuencia alélica en 1987
* p<0.05

La diversidad de los ET asociados a frijol silvestre es de 0.118 durante 1988 mientras que durante 1987 fué de 0.21, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, si se considera para la muestra de 1988 solamente las 5 enzimas analizadas durante 1987, se encuentra que la H por ET se incrementa a 0.23, siendo las diferencias estadísticas en este caso no significativas ($t=2.21$ $p>0.1$).

Las cepas asociadas a frijol silvestre forman un grupo natural que se encuentra a una distancia de 0.38 con respecto a un grupo de cepas asociadas a frijol cultivado de la colecta de 1988, mientras que el resto de las otras cepas asociadas a P. vulgaris cultivado se encuentran a una distancia genética mayor de 0.43 (Figura 8). Las cepas asociadas a frijol cultivado de los dos años de estudio forman un grupo relativamente homogéneo con una distancia máxima de 0.32, existiendo un grupo de cepas ob-

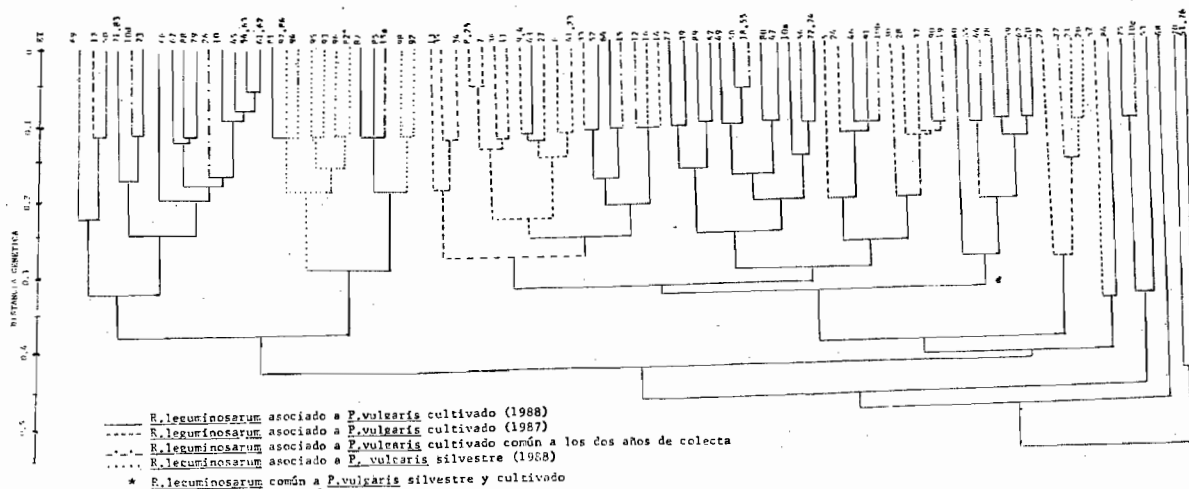


Figura 8: Dendrograma de Nei donde se muestran las distancias genéticas entre los ET de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a Phaseolus vulgaris cultivado y silvestre, de la región del Tepozteco, Morelos.

distancia de 0.442. Asimismo existe un pequeño grupo de bacterias asociadas a frijol cultivado de 1988 que se encuentra muy distante de todo lo demás (0.56 de distancia máxima).

En la tabla 20 se observa la diversidad genética para las tres poblaciones asociadas a P.coccineus, donde se encuentra que la población cultivada es muy poco diversa ($H=0.05$), presentando sólo 3 loci polimórficos. La población silvestre de Tepoztlán es un poco más diversa y la silvestre de Nepoalco es la de mayor diversidad genética.

TABLA 20

DIVERSIDAD GENETICA POR ENZIMA EN Rhizobium leguminosarum BIOVAR phaseoli ASOCIADO A P.coccineus EN 3 SITIOS DEL ESTADO DE MORELOS

| ENZIMA | FRECUENCIA ALELICA | | | | H | SITIO |
|--------|--------------------|------|------|---|-------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| IDH | 1 | | | | 0 | Tepoztlán cultivado |
| 6PG | 0.84 | 0.16 | | | 0.25 | |
| MDH | 1 | | | | 0 | |
| G6P | 0.94 | 0.05 | | | 0.05 | |
| HBD | 1 | | | | 0 | |
| PEP | 0.84 | 0.16 | | | 0.25 | |
| XDH | 1 | | | | 0 | |
| EST1 | 1 | | | | 0 | |
| EST2 | 1 | | | | 0 | |
| TOTAL | | | | | 0.058 | |
| IDH | 0.93 | 0.07 | | | 0.07 | Tepoztlán silvestre |
| 6PG | 0.33 | 0.60 | 0.07 | | 0.49 | |
| MDH | 1 | | | | 0 | |
| G6P | 0.93 | 0.07 | | | 0.07 | |
| HBD | 0.73 | 0.27 | | | 0.35 | |
| PEP | 0.07 | 0.86 | | | 0.20 | |
| XDH | 0.80 | 0.13 | 0.07 | | 0.29 | |
| EST1 | 0.86 | 0.14 | | | 0.19 | |
| EST2 | 1 | | | | 0 | |
| TOTAL | | | | | 0.185 | |

continuación tabla 20

| ENZIMA | FRECUENCIA ALELICA | | | | H | SITIO |
|--------|--------------------|------|------|------|-------|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| IDH | 0.90 | 0.10 | | | 0.13 | Nepopoalco silvestre |
| 6PG | 0.45 | 0.20 | 0.05 | 0.05 | 0.74 | |
| MDH | 0.75 | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 0.39 | |
| G6P | 0.53 | 0.30 | 0.17 | | 0.62 | |
| HBD | 0.35 | 0.30 | 0.25 | | 0.72 | |
| PEP | 0.05 | 0.70 | 0.25 | | 0.43 | |
| XDH | 1 | | | | 0 | |
| EST1 | 1 | | | | 0 | |
| EST2 | 1 | | | | 0 | |
| TOTAL | | | | | 0.335 | |

A partir de datos electroforéticos de las bacterias que nodulan en frijol ayocote y en frijol común (Tablas 5, 7, 9 y 11) se obtuvo la matriz de distancias para todas las cepas de R. leguminosarum biovar phaseoli aisladas en Morelos, tanto en P. vulgaris como en P. coccineus cultivado y silvestre; con ellas se construyó un dendrograma de Nei (Figura 9). En este dendrograma se observa una estructura similar a la de la figura 8 donde las cepas asociadas a P. vulgaris silvestre forman un grupo homogéneo que se encuentra relacionado con un grupo de cepas asociadas a frijol cultivado de la colecta de 1988, asimismo, la mayor parte de las cepas asociadas a P. vulgaris cultivado de los dos años de estudio y las cepas obtenidas de P. coccineus cultivado forman un grupo relativamente homogéneo con una distancia máxima de 0.35. Mientras que las cepas aisladas de P. coccineus silvestre tanto de Tepoztlán como de Nepopoalco forman dos grupos aislados con ninguna cepa común entre P. vulgaris silvestre de Tepoztlán y P. coccineus silvestre del mismo sitio. La mayor parte de los aislados (los 2 ET más abundantes) obtenidos de P. coccineus cultivado de Tepoztlán son idénticos a los obtenidos en P. vulgaris cultivado.

C) Diferenciación entre subpoblaciones de Rhizobium asociado a frijol en Morelos.

La diferenciación entre las subpoblaciones observada en este estudio se muestra en la tabla 21. Las Gst obtenidas son bastante altas en las diferentes subpoblaciones de rizobio asociado a frijol cultivado y silvestre, tanto para P. vulgaris como para P. coccineus. Esta también es alta entre las diversas subpoblaciones silvestres, lo cual corrobora la estructura en el dendrograma (Figura 9) donde se observa que las tres subpoblaciones silvestres se encuentran muy separadas entre sí y

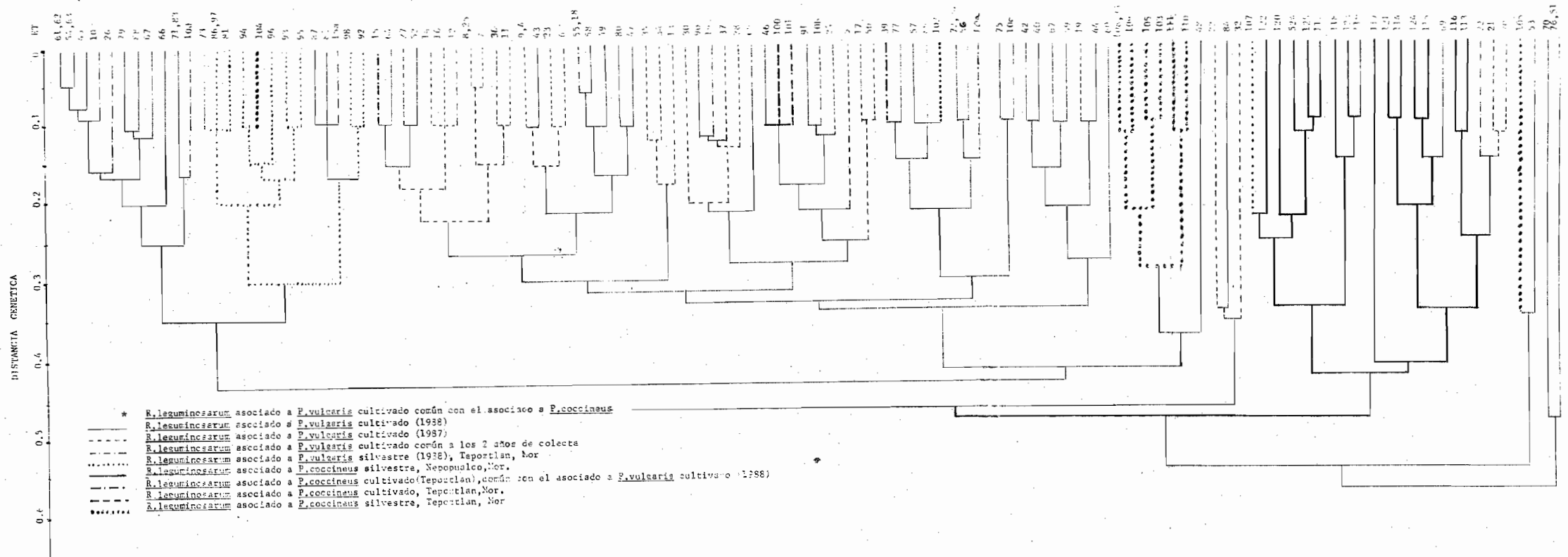


Figura 9: Dendrograma para las cepas aisladas en P. vulgaris y P. coccineus cultivado y silvestre en Nepopoalco, Tepoztlán y Santiago Tepetlapa, Morelos, en 1987 y 1988

aisladas de la mayor parte de las cepas cultivadas. Asimismo existe muy poca diferenciación entre el total de las cepas asociadas a P.vulgaris.

TABLA 21

DIFERENCIACION ENTRE SUBPOBLACIONES DE Rhizobium ASOCIADO A Phaseolus SILVESTRE Y CULTIVADO EN MORELOS

| SUBPOBLACIONES | Gst |
|--|------|
| <u>P.vulgaris</u> cultivado/silvestre | 0.40 |
| <u>P.vulgaris</u> / <u>P.coccineus</u> cultivado | 0.89 |
| <u>P.coccineus</u> cultivado/silvestre (Tepoztlán) | 0.59 |
| <u>P.coccineus</u> silvestre Tepoztlán/Nepopoalco | 0.20 |
| <u>P.vulgaris</u> / <u>P.coccineus</u> silvestre Tepoztlán | 0.50 |
| total <u>P.vulgaris</u> | 0.03 |
| total <u>P.coccineus</u> | 0.35 |

DISCUSION

I.-ECOLOGIA

A) Descripción de la abundancia de las cepas de Rhizobium en los sitios de estudio

El hecho de encontrar electrotipos comunes a los dos años de estudio en el sitio de frijol común, sugiere que estas cepas comunes lograron sobrevivir a la temporada de sequía y que la estructura de la población se mantiene, ya que los electrotipos más abundantes de 1987 siguen predominando al año siguiente. En E. coli se observó que se pueden distinguir dos tipos de cepas, las residentes, las cuales son abundantes y permanecen por periodos largos de tiempo y las transitorias las cuales tienen frecuencias bajas y sólo se presentan por días o semanas, desapareciendo posteriormente (Caugant et al., 1981). En este estudio se podría pensar que los electrotipos comunes a los dos años son residentes de este campo de cultivo, mientras que las otras cepas típicas de 1987 aparentemente son transitorias. La población de P. coccineus cultivado tiene una estructura totalmente diferente, donde dos cepas comunes al cultivar de frijol común representan el 86.6% de la población, esto probablemente refleja una situación de empobrecimiento de la diversidad del sitio ya que sólo se observan 4 ET diferentes, de los cuales la mayor parte pertenecen a cultivos típicos de P. vulgaris.

Por otra parte, en el sitio de P. vulgaris silvestre la estructura parece ser muy diferente a la del sitio cultivado ya que en cada año un ET distinto es el más frecuente. Además el no encontrar ningún ET común en los dos años de estudio, sugiere que las condiciones ambientales a las que se ven sujetas las cepas de Rhizobium son severas en el sitio silvestre, ya que la temporada de secas es muy larga y esto puede disminuir en gran medida la probabilidad de sobrevivencia de un año a otro, aunque es posible de que algunas cepas puedan sobrevivir a éstas condiciones al mantenerse en grumos de suelo que permanecen húmedos aún en época de sequía (Alexander, 1984). Asimismo, es necesario muestrear a la población de rizobios no simbióticos que permanecen en el suelo, ya que estos podrían representar una fuente importante de Rhizobium capaz de nodular durante la temporada siguiente, al adquirir estos el plásmido simbiótico por transferencia horizontal (Segovia com.pers.).

El hecho de encontrar, durante 1988, un ET común al cultivo

Rhizobium por viento (Alexander, 1984), ya que ambos sitios se encuentran a aproximadamente 6 km en línea recta. En otras bacterias se ha observado que existen mecanismos eficientes de dispersión, tanto por viento como a través de sus hospederos. Por ejemplo, la presencia de una misma clona de E. coli en dos continentes diferentes, sugiere una dispersión eficiente por medio del hospedero (Selander et al., 1987). Por otra parte, en la población asociada a P. coccineus de Nepopoalco se encuentran 3 ET comunes al sitio de P. vulgaris cultivado, lo cual tal vez indique procesos de dispersión entre estos dos sitios. Esto no ocurre en el sitio de Tepoztlán, donde a pesar de que en él se muestrearon 3 poblaciones diferentes, ninguna de ellas comparte ningún electrotipo lo cual tal vez indique procesos de especificidad muy estrictos que separan a los rizobios asociados a P. vulgaris silvestre de los de P. coccineus silvestre y estas dos poblaciones se aíslan a su vez de la asociada a P. coccineus cultivado, sin embargo, la hipótesis de la especificidad es necesaria probarla posteriormente de manera experimental.

En la población asociada a P. coccineus silvestre de Nepopoalco se observó una estructura bastante homogénea, ya que en ellas cada ET representa una proporción similar dentro de la población. Mientras que en el sitio de frijol ayocote silvestre de Tepoztlán se observa el caso del ET 103 que representó 1/3 de la población de rizobios, mientras que los demás ET estuvieron distribuidos de manera bastante equitativa.

B) Distribución espacial de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli asociado a frijol común silvestre y cultivado

El hecho de que la prueba de Mantel mostrara que de todas las plantas analizadas sólo una planta de Phaseolus vulgaris cultivado presentó correlación positiva entre la distancia genética de las cepas dentro de una raíz y la distancia espacial entre nódulos, indica que el suelo de la parcela cultivada se comporta en general de manera dinámica, por lo que los nódulos se van formando a partir de las cepas que se encuentran distribuidas más o menos al azar alrededor de la rizósfera. Este efecto probablemente se deba a que las prácticas de cultivo tienden a homogenizar al suelo con la ayuda del arado, por lo que las bacterias se distribuyen a lo largo de todo el campo de cultivo.

Por otra parte, el problema es más complejo, ya que se observó que dentro de una raíz es común encontrar cepas que tienen una distribución agregada. En la raíz entonces puede existir contagio de una cepa hacia varios nódulos cercanos en el momento de la formación de estos. Esto mismo observaron Young et al. (1987) en rizobio asociado a chícharo, donde existe también una fuerte probabilidad de contagio por la misma cepa en los nódulos vecinos. El fenómeno de agregación es común en enfermedades producidas por microorganismos en el hombre, donde unos cuantos individuos presentan altas densidades de microparásitos y

estos los transmiten de manera contagiosa a las personas que se encuentran cerca de ellas (Anderson, 1982).

A nivel poblacional se observó que las cepas de Rhizobium no se encuentran correlacionadas con el ambiente que las rodea, al menos al nivel que se evaluaron los parámetros del suelo y de la planta. Esto se puede deber entre otras cosas a que el nivel de percepción del ambiente por parte de los rizobios es a nivel más microscópico, por lo que tal vez habría que medir los factores fisicoquímicos de la rizósfera y las diferencias entre las raíces.

C) Patrones de diversidad ecológica y dominancia en 5 sitios de Rhizobium durante 1988

El sitio de frijol común cultivado presentó una diversidad mayor y una menor dominancia que en el sitio de frijol común silvestre, mientras que en las poblaciones de Rhizobium asociado a frijol ayocote ocurrió lo contrario, el sitio menos diverso que el cultivado y el más diverso es el silvestre de Nepoalco. Se ha reportado que las prácticas tradicionales de cultivo generan una mayor diversidad de especies asociadas al cultivar, esto se observó en un estudio comparativo, efectuado en el desierto de Sonora entre una comunidad agrícola de los indios Papagos y un sitio similar silvestre. Lo contrario ocurre en sitios donde se aplican métodos agrícolas modernos (Nabhan et al., 1982). En cuanto a estudios comparativos entre bacterias silvestres y su contraparte asociada al hombre no existen datos que hablen de la diversidad ecológica y la dominancia. Estas observaciones tal vez pueden indicar que la parcela cultivada de frijol común es más diversa ecológicamente debido a que el hombre a través de la práctica agrícola tradicional enriquece la diversidad de especies asociadas al cultivar. Sin embargo esto no explica el por que de la baja diversidad del sitio del frijol ayocote cultivado. Por lo que sería necesario estudiar más sitios silvestres y compararlos con sitios de frijol cultivado.

Por otra parte, las diferencias tan notables entre los dos sitios de P.vulgaris se pueden deber en parte a que se trata de dos sitios sumamente diferentes edaficamente, ya que mientras que el sitio de frijol cultivado presenta las condiciones de nutrientes óptimas para el desarrollo de Rhizobium, en el sitio silvestre las condiciones de nodulación pueden ser difíciles debido a la falta de calcio y al exceso de nitrógeno. Por ejemplo se ha reportado que el comportamiento de Bradyrhizobium japonicum varía a lo largo de un gradiente altitudinal, ya que la temperatura del sitio afecta en el número de nódulos y peso de estos a lo largo del gradiente (George et al., 1987). Por lo que a las diferencias en el suelo en ambos sitios podemos agregarle que el sitio de frijol silvestre es más alto que el de frijol cultivado. Todo esto podría indicar que la parcela de frijol común cultivado

es más diversa y no presenta dominancia debido a que las condiciones ambientales en este sitio son buenas para el desarrollo de Rhizobium. En el sitio de frijol común silvestre, aparentemente, las condiciones son difíciles para esta bacteria por lo que encontramos una comunidad empobrecida donde una cepa dominante y bien adaptada a las condiciones ambientales puede ocupar la mayor parte de los sitios de nodulación. El hecho de considerar a Tepoztlán como un sitio pobre para el desarrollo de Rhizobium también puede explicar en parte la baja diversidad del sitio de ayocote cultivado, ya que la diversidad de las tres poblaciones que se encuentran en Tepoztlán son las de menor diversidad ecológica y las de mayor dominancia.

Por otra parte, el encontrar una dominancia tan pequeña en la parcela cultivada puede ser importante desde el punto de vista de la reintroducción de cepas mejoradas. Estudios anteriores elaborados con Rhizobium suponían que existen algunas cepas dominantes más competitivas en los campos de cultivo, por lo que ocuparían la mayor parte de los sitios de nodulación (Brockell y Dudman, 1968; Kalusta y Rouwenhorst, 1973; Robert y Schmidt, 1985; Kamicker y Brill, 1986; Lieberman et al., 1986). Por otra parte, otros autores enfatizan la importancia de los estudios ecológicos antes de reintroducir organismos manipulados por el hombre, ya que el conocer la ecología de los organismos "silvestres" en sus ambientes naturales promueve una mayor efectividad y evita problemas potenciales generados por los organismos que han sido sujetos a la ingeniería genética (Tiedje et al., 1989).

Los resultados obtenidos en éste trabajo podrían sugerir estrategias de reintroducción de cepas con una mayor capacidad de nodular y de fijar nitrógeno. Debido a que el sitio de frijol común cultivado no presenta dominancia, una posibilidad de inoculación exitosa de Rhizobium sería el liberar bacterias muy competitivas obtenidas de otro sitio con características ambientales y edáficas similares. Esto permitiría tener plantas de frijol con alta productividad y valor alimenticio sin el uso de fertilizantes nitrogenados, los cuales son caros y contaminantes.

II.- GENÉTICA DE POBLACIONES

A) Diversidad genética en diferentes niveles de organización para Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli en Morelos.

En algunas leguminosas se ha reportado una incidencia desde un 15% hasta un 25% de nódulos ocupados por más de un serotipo (Demezas y Bottomley, 1986). Sin embargo, se considera que en general los nódulos se encuentran ocupados por una sola cepa de Rhizobium (Hudges y Vincent, 1980). Esto fue confirmado en este estudio ya que el 100% de las cepas de un nódulo correspondieron a una sola clona, tanto en la población de P.vulgaris silvestre

como en la cultivada.

El fenómeno de la jerarquización de la diversidad genética fué analizado anteriormente en otras bacterias, en E. coli la diversidad genética encontrada en niños es más baja (0.44) pero similar a la observada para el total de la población (0.47) (Selander y Levin, 1980). Young et al. (1987) observaron con electroforesis de tres enzimas polimórficas que en Rhizobium leguminosarum biovar vicea asociado a chícharo en Inglaterra, una gran diferenciación entre los nódulos que se encuentran en la raíz principal y los de las raíces laterales, la población de rizobia de cada planta es muy diversa ($H=0.57$), representando una planta casi la totalidad de la diversidad de la población ($H=0.59$). Esto indica que la jerarquización de la diversidad es muy baja tanto en E. coli como en R. leguminosarum biovar vicea. Mientras que en éste estudio, Rhizobium asociado tanto a frijol cultivado como a silvestre presenta una jerarquización clara de la diversidad genética en los diferentes niveles de estudio.

Si consideramos que los rizobios son clonales, entonces, cada ET podría llamarse un "gamodemo" (población aislada reproductivamente) dentro de una "comunidad" de rizobios. Pielou (1975) sugiere que la diversidad entre niveles jerárquicos no debe de determinarse por la riqueza de especies sino por la diversidad de gamodemos. Los ecosistemas presentan numerosos ejemplos de la jerarquización entre los niveles de organización (Begon et la., 1986) por lo que parece que este es un fenómeno común en la naturaleza.

Por otra parte, a diversidad genética por ET no varía significativamente de un año a otro ($p > 0.1$) a pesar de que las diversidades por enzima si varían. Esto indica que estructura de la población cambia de un año a otro aunque la diversidad genética promedio se mantenga similar. Esto mismo fue observado por Young et al. (1987) con R. leguminosarum biovar vicea en dos sitios que tienen diversidades genéticas similares. Los resultados presentados en ésta tesis refuerzan la idea de Selander et al. (1987) de que existe clonalidad en las poblaciones bacterianas, ya que aquellas cepas observadas en ambos años de estudio se mantuvieron sin cambios alélicos, por lo que podemos suponer que no existe la recombinación genética que altere esta combinación específica de genes. Mientras que a nivel poblacional, el cambio en las frecuencias alélicas, de un año al otro, probablemente se debe a la aparición de cepas nuevas transitorias.

Mientras que la diversidad observada por Piñero et al (1988), en Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli entre 46 ETS de todo el mundo para 15 enzimas metabólicas fué de 0.691, la encontrada en este estudio es menor ($H=0.40$). Sin embargo hay que

contrada en este estudio es menor ($H=0.40$). Sin embargo hay que resaltar que esta es un colección de 66 ET's dentro de un solo sitio cultivado. Al comparar la diversidad reportada en este trabajo con la de otras bacterias (Tabla 22), se corrobora que Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli es un grupo de bacterias muy diverso genéticamente aún cuando comparamos esta especie con otros géneros bacterianos (Tabla 23).

TABLA 22

DIVERSIDAD GENETICA DE DIVERSOS GRUPOS DE ORGANISMOS

| GRUPO DE ORGANISMOS | TAMAÑO DE MUESTRA* | H | AUTORES |
|----------------------|--------------------|-------|--------------|
| BACTERIAS | 19 | 0.261 | ver tabla 23 |
| INSECTOS | 123 | 0.081 | Nevo (1978) |
| VERTEBRADOS | 184 | 0.041 | Nevo (1978) |
| DICOTILEDONEAS | 40 | 0.052 | Nevo (1978) |
| CONIFERAS | 20 | 0.207 | Nevo (1978) |
| <u>Rhizobium spp</u> | 4** | 0.432 | ver tabla 23 |

* ESPECIES DIFERENTES DENTRO DE CADA GRUPO

**INCLUYE A LOS TRES BIOVARES DE R.leguminosarum Y A R. meliloti

TABLA 23

LA DIVERSIDAD GENETICA POR ELECTROTIPO EN BACTERIAS ESTUDIADAS POR METODOS DE ELECTROFORESIS EN GEL.

| ESPECIE | DIVERSIDAD H | No DE CEPAS | LOCI | AUTORES |
|-------------------------------|---------------|-------------|----------|---|
| <u>Escherichia coli</u> | 0.39 0.428 | 550 3609 | 20 35 | Caugant et al., 1981 Selander et al., 1987 |
| <u>Shigella bonydii</u> | 0.289 | 24 | 12 | Selander et al., 1987 |
| <u>Shigella dysenteriae</u> | 0.25 | 10 | 12 | " " |
| <u>Shigella flexneri</u> | 0.174 | 51 | 12 | " " |
| <u>Shigella sonnei</u> | 0.0 | 38 | 12 | " " |
| <u>Haemophilus influenzae</u> | 0.467 | 2209 | 17 | Musser et al., 1988 |
| <u>H. pleuropneumoniae</u> | 0.428 | 135 | 15 | Musser et al., 1987 |
| <u>Legionella pneumophila</u> | 0.312 | 292 | 22 | Selander et al., 1985 |
| <u>Frankia spp.</u> | 0.78 | 40 | 7 | Gardes et al., 1987 |
| <u>B. bronchiseptica</u> | 0.248 | 303 | 15 | Musser et al., 1987 |

continuación tabla 23

| ESPECIE | DIVERSIDAD H | No DE CEPAS | LOCI | AUTORES |
|---|-----------------|----------------|------|----------------------|
| <u>Salmonella choleraesuis</u> | 0.165 | 85 | 23 | Beltran et al., 1988 |
| <u>Salmonella derby</u> | 0.258 | 349 | 23 | " " |
| <u>Salmonella dublin</u> | 0.101 | 115 | 23 | " " |
| <u>Salmonella enteritidis</u> | 0.176 | 257 | 23 | " " |
| <u>Salmonella heidelberg</u> | 0.092 | 204 | 23 | " " |
| <u>Salmonella infantis</u> | 0.152 | 113 | 23 | " " |
| <u>Salmonella newport</u> | 0.149 | 105 | 23 | " " |
| <u>Salmonella typhimurium</u> | 0.114 | 299 | 23 | " " |
| <u>Rhizobium</u> * | 0.5 | 252 | 3 | Young 1985 |
| <u>R.leguminosarum</u> (biovar viceae) | 0.465 | 249 | 3 | Young et al., 1987 |
| (biovar phaseoli) | 0.691 | 51 | 15 | Pinero et al., 1988 |
| <u>R.leguminosarum</u> (biovar phaseoli) | | | | |
| asociado a <u>P.vulgaris</u> cultivado 1988 | 0.407 | 189 | 9 | este estudio |
| silvestre 1988 | 0.118 | 33 | 9 | " " |
| asociado a <u>P.coccineus</u> cultivado 1988 | 0.058 | 15 | 9 | este estudio |
| silvestre Tepoztlán | 0.185 | 15 | 9 | " " |
| silvestre Nepoalco | 0.335 | 20 | 9 | " " |

* Esta colección incluye a R.meliloti y R.leguminosarum biovar phaseoli, viceae y trifolii

Por otra parte, en el dendrograma que se obtuvo de los dos años de estudio en el sitio de P.vulgaris cultivado, se observa que la mayoría de los electrotipos exclusivos de 1987 forman un grupo relativamente aislado, este fenómeno indica que el muestreo de un año a otro no es aleatorio, esto se puede deber a la estructura clonal de las poblaciones de esta bacteria, y a que la mayoría de las cepas de un año se considerarían transitorias, como se ha demostrado que se comportan las poblaciones de E.coli en el intestino humano (Caughant et al., 1984). Otro hecho interesante es que los ET comunes a los dos años de estudio, están insertados en medio de los exclusivos de 1988 junto con algunos de los ET exclusivos de 1987, lo cual indica que ambas parcelas están colonizadas por el mismo grupo de bacterias, así como que existe un grupo más heterogéneo de cepas de 1987 que es genéticamente similar a las cepas de 1988, y es dentro de estas bacterias que se encuentran las cepas residentes capaces de

resistir la época de sequía. Asimismo se observa un pequeño grupo de cepas que son muy diferentes al resto de la población ya que se encuentran a una distancia genética mayor de 0.5, estas bacterias son Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli ya que son capaces de nodular efectivamente en frijol, sin embargo la distancia genética a la que se encuentran nos indica la gran heterogeneidad genética de este biovar bacteriano y de los problemas taxonómicos que este presenta (Piñero et al., 1989).

Si comparamos a este árbol de relaciones genéticas con los reportados para otras bacterias, encontramos que esta muestra de rizobio es bastante heterogénea ya que la distancia máxima es similar a la reportada para otras bacterias heterogéneas como Haemophilus influenzae (Musser et al., 1988), H. pleuropneumoniae (Musser et al., 1987a) Bordetella brochiseptica (Musser et al., 1987b) y Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli (Piñero et al., 1988). Todos ellos con una distancia genética máxima mayor a 0.5. Por otra parte, existen varias de las especies bacterianas que presentan dendrogramas más homogéneos, con distancias genéticas máximas por abajo de 0.45 como es el caso de E. coli (Selander et al., 1987) Legionella pneumophila (Selander et al., 1985) y Salmonella spp (Beltran et al., 1988).

Los electrotipos 49 y 85 no nodularon, posiblemente porque estas cepas perdieron posteriormente al plásmido sym, que es donde se encuentran codificados los genes de la nodulación y la fijación de nitrógeno en Rhizobium (Flores et al., 1988). El hecho de que se encuentren dentro de los cúmulos de rizobia capaces de nodular, desecha la hipótesis de que se trate de bacterias de otro género. Se ha reportado con anterioridad la inestabilidad del plásmido sym en algunas cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli (Flores et al., 1988), por lo que aquellas cepas que originalmente eran capaces de nodular al frijol pueden perder esta característica al ser manejados bajo condiciones de laboratorio.

En la población de rizobia asociados a frijol común silvestre, se encontró que la diversidad por ET es de 0.118 para 1988 y de 0.216 para 1987. En cuanto a estudios comparativos entre bacterias silvestres y su contraparte asociada al hombre solo existe un estudio con Legionella pneumophila aislada de hospitales y de ambientes naturales (Selander et al. 1985), sin embargo, se presentaron algunos problemas de muestreo en este trabajo ya que para las bacterias "cultivadas" que fueron aisladas de hospitales de todo el mundo se tiene un tamaño de muestra grande (170 cepas), de la muestra ambiental sólo se tienen 23 cepas, de las cuales tres se consideran de otra especie. En ese estudio se encontró que la diversidad genética es muy similar en ambos sitios.

La teoría sobre la domesticación de las plantas indica que al cultivar a una planta el hombre busca homogenizar tanto a la

planta como al suelo a través de la selección artificial y a las prácticas de cultivo (Ford-Loyd y Jackson, 1986). Por lo que esperaríamos que un medio homogéneo se traduzca en una diversidad baja de rizobia. El sitio de frijol silvestre presenta una mayor heterogeneidad de ambientes, por lo que se esperaría una mayor diversidad de rizobia generada por la colonización de nichos heterogéneos. Se ha demostrado que la heterogeneidad ambiental incrementa la posibilidad de coexistencia de especies similares, que en un ambiente homogéneo no podrían coexistir debido a la competencia entre ellas (Hanski, 1981). Sin embargo, como las condiciones del suelo no son las óptimas para el desarrollo de Rhizobium en el sitio de frijol silvestre, esto podría tener un efecto negativo sobre las poblaciones de esta bacteria reduciendo su diversidad genética.

Se observó que la diversidad genética de las tres poblaciones de rizobios asociados a P. coccineus presenta un patrón diferente al que se encontró en las dos poblaciones asociadas a P. vulgaris ya que la población de Nepoalco es la más diversa ($H=0.32$), mientras que las dos poblaciones de Tepoztlán, tanto la cultivada ($H=0.05$) como la de frijol ayocote silvestre ($H=0.20$) son bastante pobres.

El hecho de que el sitio de Tepoztlán presente tan baja diversidad genética, tanto en las bacterias asociadas a frijoles silvestres como a cultivados de ambas especies sugiere que por alguna razón este sitio es pobre para las bacterias. Los análisis de suelos efectuados en el sitio de P. vulgaris silvestre, el cual se encuentra a escasos metros de los sitios de colecta de P. coccineus de Tepoztlán, demuestran que en efecto existen cantidades de calcio muy por abajo de lo que requiere esta bacteria para nodular (Kijne et al., 1988) así como un exceso de nitrógeno total el cual también inhibe a la nodulación (Dart y Mercer, 1965). Por lo que las bacterias que aislamos a partir de los nódulos de frijol silvestre de las dos especies probablemente, han sido seleccionadas para sobrevivir y nodular bajo estas difíciles condiciones ambientales, mientras que la bajísima diversidad genética observada en el sitio de P. coccineus cultivado en Tepoztlán se podría deber a que estas bacterias "típicamente cultivadas" no han pasado por el proceso adaptativo que les permita nodular adecuadamente en frijol. Este hecho tendría que ser demostrado más ampliamente por medio del análisis de más sitios de Rhizobium tanto asociados a frijol silvestre como a frijol cultivado.

Un hecho interesante es que en el dendrograma de los rizobios asociado a Phaseolus vulgaris silvestre y cultivado se observa claramente que las cepas que nodulan en frijol silvestre son un grupo natural bien diferenciado emparentado con un grupo de cepas asociadas a frijol cultivado de la colecta de 1988, ambos grupos se encuentran claramente separados del resto de las cepas asociadas a frijol cultivado de los dos años de estudio.

Dentro del grupo de cepas asociadas a P. vulgaris cultivado se encuentran las cepas típicas de 1987, las cuales continúan formando un grupo aparte de las cepas típicas de 1988, sin embargo estos dos grupos se encuentran más emparentados entre sí que las cepas asociadas a frijol cultivado similares a las asociadas a frijol silvestre. Esto sugiere que en el campo de cultivo existen a grandes rasgos, dos tipos de cepas: aquellas derivadas de Rhizobium silvestre de la región del Tepozteco, a las cuales las podemos denominar como cepas locales y las cepas genéticamente separadas de las silvestres, a estas las podemos llamar cepas colonizadoras ya que probablemente se encuentren en la parcela de cultivo debido a que el hombre transporta semillas de frijol de un lado a otro del país, aportando de esta forma nuevas cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli al campo de cultivo. Este mismo hecho tal vez podría explicar la presencia del grupo de cepas con una distancia genética mayor a 0.5, ya que estas pudieron provenir, junto con las semillas, de lugares lejanos con suelos muy diferentes a los del centro de la República Mexicana. Sin embargo, estas son hipótesis que requieren de un muestreo extensivo en el país para poder ser demostradas. Otra posibilidad es que las cepas que presentan distancias genéticas mayores a 0.5 sean bacterias ajenas a este biovar las cuales adquirieron el plásmido sym por transferencia horizontal. Para comprobar esta hipótesis se requiere la secuenciación tanto del cromosoma como del plásmido de unas cepas "típicas" y compararlas con las secuencias de las cepas distantes.

Al realizar el dendrograma para las 5 subpoblaciones de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli en el estado de Morelos se observa que Rhizobium asociado a Phaseolus vulgaris silvestre sigue siendo un grupo natural que solo está emparentado a las cepas locales asociadas a P. vulgaris cultivado. Por otra parte, las cepas asociadas a P. coccineus silvestre de Nepoalco, forman otro grupo aislado al igual que las cepas asociadas a P. coccineus silvestre de Tepoztlán; siendo ambos grupos muy diferentes genéticamente a las cepas asociadas a P. vulgaris tanto silvestre como cultivado. Mientras que las cepas asociadas a frijol común cultivado de los dos años de estudio forman un grupo heterogéneo en el cual se mezclan las bacterias que nodulan en P. coccineus cultivado con las que nodulan en P. vulgaris cultivado, existiendo inclusive 2 ET's comunes en los dos sitios (los cuales representan más del 86% de la población de P. coccineus cultivado). Esto confirma la idea expuesta anteriormente de que este sitio de frijol ayocote cultivado es muy poco diverso debido a que presenta cepas "típicamente cultivadas" que no han pasado por el largo proceso de adaptación a este sitio pobre en nutrientes.

Por otra parte, el grupo de cepas asociadas a frijol común cultivado que presentaban una gran distancia genética con respecto a las demás cepas, ahora se encuentra más emparentado con las cepas asociadas a P. coccineus silvestre de Nepoalco que

con las cepas que nodulan en P.vulgaris, lo cual puede indicar que estas cepas se originaron en otra región de Morelos y que inicialmente nodulaban al frijol ayocote y por las prácticas agrícolas se fueron adaptando a nodular en P.vulgaris cultivado y posteriormente fueron transportadas junto con las semillas a la región del Tepozteco. Estos datos también indican que aquellas cepas capaces de nodular tanto en P.coccineus como en P.vulgaris cultivado son más similares entre si que sus contrapartes silvestres, lo cual indica que las poblaciones silvestres se encuentran aisladas genéticamente del resto de las cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli.

C) Diferenciación entre subpoblaciones de Rhizobium asociado a frijol en Morelos.

Los datos obtenidos en este trabajo sobre la alta diferenciación entre las subpoblaciones estudiadas refuerzan la idea de que la domesticación del frijol tiene una gran influencia sobre las poblaciones de Rhizobium asociado a sus raíces, ya que las Gst más altas se presentaron al comparar las poblaciones asociadas a frijol cultivado con las asociadas a frijol silvestre, esto también se podría deber a que las poblaciones silvestres forman "islas" aisladas del resto de los rizobios asociados a frijoles cultivados; por lo que estas poblaciones se han diferenciado a lo largo del tiempo. Por otra parte, el encontrar una diferenciación tan alta entre la población asociada a frijol ayocote cultivado y la de frijol común cultivado se debe en parte a un efecto de tamaño de muestra y a la posible pobreza de habitat donde se encuentra el frijol ayocote cultivado, ya que en la parcela de Santiago Tepetlapa se obtuvieron 66 ET durante 1988 mientras que el sitio de Tepoztlán presentó solo 4 ET asociados a P. coccineus.

En otros estudios sobre la Gst reportados en la literatura (Tabla 24). Se observa que en general las diferenciaciones entre subpoblaciones son más bajas que las encontradas en este estudio, siendo en promedio de 0.109 para todas las especies bacterianas reportadas.

TABLA 24

DIFERENCIACION ENTRE SUBPOBLACIONES BACTERIANAS ANALIZADAS POR MEDIO DE ELECTROFORESIS

| ESPECIE BACTERIANA | SUBPOBLACIONES A COMPARAR | Gst | REFERENCIA |
|---|------------------------------|-------|------------------------|
| <u>E. coli</u> | niños-total | 0.06 | Selander y Levin, 1980 |
| | fuentes de infección | 0.007 | Selander et al., 1987 |
| | métodos de clasificación | 0.04 | " " " |
| | Europa y Norteamérica | 0.008 | " " " |
| <u>H. pleuropneumoniae</u> | serotipos | 0.431 | Musser et al., 1987a |
| | Europa y Norteamérica | 0.18 | " " " |
| <u>H. influenza</u> | serotipos | 0.326 | Musser et al., 1988 |
| <u>B. bronchiseptica</u> | huespedes | 0.05 | Musser et al., 1987b |
| <u>L. pneumophila</u> | sitios | 0.002 | Selander et al., 1985 |
| | serotipos | 0.05 | " " " |
| | especies similares | 0.07 | " " " |
| <u>Salmonella</u> spp. | especies | 0.43 | Beltran et al., 1988 |
| <u>R. leguminosarum</u> biovar <u>vicea</u> | plantas | 0.02 | Young et al., 1987 |
| | sitios | 0.006 | " " " |
| | forma de muestrear | 0.03 | " " " |
| <u>R. leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u> | México y Sudamérica | 0.035 | Piñero et al., 1988 |
| | sitios de frijol común* | 0.402 | Este estudio |
| | sitios de frijol ayocote | 0.351 | " " |
| | cultivado/silvestre** | 0.592 | " " |
| | 5 subpoblaciones de frijol** | 0.341 | " " |

* cultivado y silvestre

** P. coccineus

Estas diferenciaciones pequeñas que se reportan en la literatura se pueden deber a diversas razones. En el caso de E. coli se supone que la diferenciación tan pequeña que existe tanto entre continentes, como entre las bacterias que se encuentran en niños o en la población general, así como entre las bacterias que provienen de diferente fuente de infección; se debe a la dispersión tan amplia que tiene este organismo y a que las colonizaciones sucesivas por parte de bacterias transitorias tiende a homogenizar a las poblaciones (Selander et al., 1987). Este mismo fenómeno de dispersión amplia que homogeniza poblaciones, parece ocurrir en Bordetella bronchiseptica (Musser

et al., 1987b) donde la diferenciación entre huéspedes de especies diferentes es muy pequeña; y en Legionella pneumophila entre sitios con diferentes ambientes y aún entre especies similares (Selander et al., 1985). En cuanto a los datos obtenidos en otros estudios con Rhizobium leguminosarum en los que también se encuentran diferenciaciones muy pequeñas, éstas se pueden deber, por una parte a un muestreo extensivo de cepas aisladas en dos regiones geográficas, y por otra parte a que todos los rizobios analizados por estos autores provienen de P. vulgaris cultivado (Piñero et al., 1988), siendo que en el presente estudio las diferenciaciones más fuertes se presentan al comparar poblaciones silvestres con cultivadas. Esto mismo puede ocurrir en el caso de los rizobios aislados de chícharo en Inglaterra, donde la diferenciación tan baja se puede deber también a que se comparan sitios muy cercanos geográficamente. Cuando comparamos diferentes métodos de clasificación encontramos en general diferenciaciones pequeñas, salvo en los casos de serotipos diferentes para Haemophilus pleuropneumoniae (Musser et al., 1987a) y H. influenzae (Musser et al., 1988) donde las Gst son similares a las encontradas en este estudio, las cuales también son comparables a las observadas entre especies diferentes del género Salmonella (Beltrán et al., 1988).

CONCLUSIONES

- 1.- Los dos sitios donde se encuentra P.vulgaris difieren significativamente en cuanto a las concentraciones de nutrientes, existiendo en el sitio cultivado más calcio y fósforo que en el sitio silvestre mientras que este último presenta más materia orgánica y nitrógeno total que la parcela cultivada.
- 2.- En el sitio cultivado de P.vulgaris, algunas de las cepas más abundantes de 1987 fueron observadas nuevamente en 1988, mientras que en el sitio silvestre de P.vulgaris no se encontró ninguna cepa común a los dos años de estudio.
- 3.- En cuanto a la distribución espacial de Rhizobium asociado a P.vulgaris se puede concluir que:
 - A) En la mayor parte de los casos el suelo donde se desarrollan las plantas es dinámico en cuanto a la población de esta bacteria, ya que no hay correlación entre la distancia espacial dentro de una raíz y la distancia genética de las cepas que nodulan en ella.
 - B) Una vez que empiezan a nodular las raíces, es más probable que la misma cepa ocupe nódulos vecinos.
 - C) No existe correlación de las cepas con el tipo de suelo que las rodea ni con la morfología de la planta donde nodulan, mientras que la planta sí responde a las variables del suelo.
- 4.- La población asociada a P.vulgaris cultivado presenta una mayor diversidad ecológica y una menor dominancia que la población asociada a P.vulgaris silvestre, En el caso de Rhizobium asociado a P.coccineus ocurre lo contrario, ya que la población cultivada es la más pobre, y la población silvestre de Nepoalco es la más diversa ecológicamente. El sitio de P.coccineus cultivado es el de mayor dominancia y el silvestre de Nepoalco el de menor.
- 5.- La diversidad genética se encuentra fuertemente jerarquizada en Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli en todos los sitios estudiados, existiendo mayor diversidad en la población que en el sitio, que dentro de una planta que dentro de un nódulo.
- 6.- La mayor diversidad genética se presentó en el sitio asociado a P.vulgaris cultivado ($H=0.40$) y la menor en el asociado a P.coccineus cultivado ($H=0.05$), las poblaciones asociadas a frijol silvestre presentan diversidades que van desde $H=0.11$ en el sitio de P.vulgaris hasta $H=0.33$ en el de P.coccineus de Nepoalco.
- 7.- Las cepas asociadas a frijol común cultivado forman dos grandes grupos, uno asociado a las cepas de frijol común silvestre y otro gran grupo heterogéneo donde la mayoría de las cepas obtenidas en 1987 son genéticamente diferentes a las ob-

tenidas en 1988, existiendo algunas cepas comunes a los dos años de estudio. Dentro de este grupo de cepas "cultivadas" se intercalan las cepas obtenidas de frijol ayocote cultivado, mientras que las dos poblaciones de frijol ayocote silvestre forman cada una de ellas un grupo aislado distante genéticamente de todas las demás. Las cepas asociadas a P.coccineus silvestre son muy diferentes a las asociadas a P.vulgaris silvestre, aún cuando estas se encuentran en un mismo sitio.

8.-Las cepas asociadas tanto a frijol ayocote como a frijol común presentan una diferenciación entre subpoblaciones (Gst) bastante grandes, siendo la diferenciación más grande la observada entre poblaciones silvestres y cultivadas, tanto en P.vulgaris como en P.coccineus.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. (1977) Introduction to soil microbiology 2a. ed. John Wiley & Sons, Nueva York, 451 pag.
- Alexander, M. (1981) Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. Ann. Rev. Microbiol. 35:113-133
- Alexander, M. (1984) Ecology of Rhizobium. En: Biological nitrogen fixation .M. Alexander (ed.) . Plenum Press, Amsterdam : 39-50
- Al-Rashidi, R.K., T.E. Loynachan y L.R. Frederick (1982) Desiccation tolerance of four strains of Rhizobium japonicum. Soil Biol. and Biochem. 14:489-493.
- Allen, O.N. y E.K. Allen (1980) The leguminosae, A source book of characteristics, uses and nodulation The University of Wisconsin Press. Wisconsin, 854 pag.
- Anderson, R.M. (1982) Transmission dynamics and control of infectious disease agents. En: R.M. Anderson y R.M. May (Eds) Population biology of infectious diseases Springer-Verlag. Berlin. pp 149-176
- Baptist, J.N., C.R. Shaw y M. Mandel (1969) Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. J. Bacteriol. 99:180-188.
- Begon, M., J. Harper y C. Townsend (1986) Ecology: individuals, populations and communities . Blackwell Scientific Publications Oxford. 876 pag.
- Beltrañ, D., J.M. Musser, R. Helmut, III J.J. Farmer, W.M. Frerichs, I.K. Wachsmutn, K. Ferris, A.C. McWhorter, J.G. Wells, A. Cravioto, y R. Selander (1988) Toward a population genetic analysis of Salmonella: Genetic diversity and relationships among strains of serotypes of S. choleraesuis, S. derby, S. dublin, S. enteritis, S. heidelberg, S. infantis, S. newport and S. typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:7753-7757.
- Bergey's (1984) Manual of systematic bacteriology 9a. ed.
- Berglund-Brucher, O. y H. Brucher (1976) The south american wild bean (Phaseolus aboriginus Burk.) as ancestor of the common bean. Econ. Bot. 30: 257-272.
- Bottomley, P.J. y M.B. Jenkins (1983) Some characteristics of Rhizobium meliloti isolates from alfalfa fields in Oregon.

Soil Sci. Soc. Am. J. 47:1153-1157.

Bowen, G.D. y M.M. Kennedy (1959) Effect of high soil temperatures on Rhizobium spp. Queensland J. of Agric. Sci. 16:117-197.

Brockell, J. y W. Dudman (1968) Ecological studies of root nodule bacteria introduced into field environments. Aust. J. Agric. Res. 19:749-757.

Brockman, F.J. y D.F. Bezdicek (1989) Diversity within serogroups of Rhizobium leguminosarum biovar viciae in the Palouse regions of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance and topography. App. and Environm. Microbiol. 55:109-115.

Burquez, A. y J. Sarukhan (1984) Biología floral de poblaciones silvestres de Phaseolus coccineus L. II. Sistemas reproductivos. Boletín de la Soc. Bot. Mex. 46:3-13.

Bushby, H. (1981) Changes in the numbers of antibiotic-resistant rhizobia in the soil and rhizosphere of field grown Vigna mungo CU. Regur. Soil Biol. Biochem. 13: 241-248.

Bushby, H. y K.C. Marshall (1977a) Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation. Soil Biol. and Biochem. 9:143-147.

Bushby, H. y K.C. Marshall (1977b) Differences among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil. App. and Environm. Microbiol. 43:435-439.

Caugant, D.A., B.R. Levin y R.K. Selander (1981) Genetic diversity and temporal variation in the E.coli population of a human host. Genetics 98:67-490.

Caugant, D.A., B.R. Levin y R.K. Selander (1984) Genetic diversity and temporal variation in the E.coli population of a human host. Genetics 98:467-490.

Cruden, D.L. y A.J. Markovetz (1987) Microbial ecology of cockroach gut. Ann. Rev. Microbiol. 41:617-643.

Chen, M. y M. Alexander (1973) Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. Soil Biol. and Biochem. 5:213-221.

Daniel, R.M., H.W. Limmer, K.W. Steele y I.M. Smith (1982) Anaerobic growth, nitrate reduction and denitrification in 46 Rhizobium strains. J. of General Microbiol. 128:1811-1815.

Dart, P.J. (1977) Infection and development of leguminous

nodules. En: R.W. Hardy y W.S. Silver (Eds.) A treatise on dinitrogen fixation. John Wiley and Sons, Nueva York 367 pag.

Dart, P.J. y F. Mercer (1965) The effect of growth temperature level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea (Vigna sinensis (L.) Savi ex Hassk). Aust. J. Agric. Res. 16: 321-345.

Delgado, A., A. Bonet y P. Gepts (1988) The wild relative of Phaseolus vulgaris in middle America. En: P. Gepts (Ed.) Genetic Resources of Phaseolus beans, Kluwer Acad. Press. Dordrecht. pp. 163-184.

Demezas, D. y P. Bottomley (1986) Autoecology in rhizospheres and nodulating behavior of indigenous Rhizobium trifolii. App. Environm. Microbiol. 52: 1014-1019.

Demezas, D., J. Watson, T. Reardon y A. Gibson (1988) A molecular approach to Rhizobium ecology. Presentado en: 4th International symposium on molecular genetics on plant-microbe interactions. Acapulco, México, Mayo 1988.

DETENAL (1979) Carta Geográfica de la zona de Cuernavaca Morelos.

Diáz, C., L. Melchers, P. Hooykaas, B. Lugtenberg y J. Kijne (1989) Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. Nature 338: 579-581.

Dietz, J.E. (1983) Permutation tests for association between two distance matrices. Syst. Zool. 32:21-26.

Dowling, D.N. y W.J. Broughton (1986) Competition for nodulation of legumes. Ann. Rev. Microbiol. 40:131-157.

Dudman, W.F. y J. Brockwell (1968) Ecological studies of root nodule bacteria introduced into field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel immune-diffusion serology. Aust. J. Agric. Res. 19:739-747.

Eaglesham, A.R. y A. Ayamaba (1984) Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume fixation. En: Subba Rao (Ed) Current developments in biological nitrogen fixation Edward Arnold Publishers, Londres, pp. 1-36.

Eaglesham, A.R., B. Seaman, S. Hossoima, A. Ayamaba, y K. Mulongoy (1981) High temperature tolerant "cowpea" rhizobia. En: Gibson A.H. y Newton W.E. (Eds.) Current perspectives in nitrogen fixation Australian Acad. Sci., Canberra 436 pag.

Eardly, R., A. Eaglesman y M. Nolt (1987) Characterization of R. leguminosarum biovar phaseoli from six agroecosystems in

Colombia. En: North American Rhizobium conference, Quebec, Canada.

Elkan, G.H. (1981) The taxonomy of Rhizobiaceae. Int. Rev. Cytol. 5:1-4

Flores, M., V. Gonzalez, M. Pardo, A. Leija, E. Martínez, R. Romero, D. Pintero, R. Davila y R. Palacios (1988) Genomic stability in Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 170: 1191-1196

Ford-Lloyd, B. y M. Jackson (1986) Plant genetic resources: An introduction to their conservation and use. Edward Arnold. Londres 146 pag.

Garcia, E. (1988) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Geocentro, 215 pag.

Gardes, M., J. Bousquet, y M. Lalonde (1987) Isozyme variation among 40 Frankia strains. Appl. Environm. Microbiol. 33: 1596-1603.

Gentry, H.S. (1969) Origin of the common bean Phaseolus vulgaris. Econ. Bot. 23:55-69

George, Th., B. Bohlool, y P.W. Singleton (1987) Bradyrhizobium japonicum environment interactions: nodulation and interstrains competition in soils along an elevational transect, Appl. Environm. Microbiol. 53:1113-1117

Gepts, P. (1988) Phaseolin as an evolutionary marker En: Genetic Resources of Phaseolus beans, Kluwer Acad. Press. Dordrecht . pp 163-184.

Gibson, A.H. y D.C. Jordan (1983) Ecophysiology of nitrogen-fixing systems. En: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, y H. Ziegler (Eds) Physiological Plant Ecology III Encyclopedia of plant physiology New Series, Vol 12C Springer Verlag. Berlin. pp.301-390.

Greig-Smith, P. (1983) Quantitative plant ecology 3a edic. Blackwell Sci. Pub. Oxford 580 pag.

Hanski, I. (1981) Coexistence of competitors in patchy environments with and without predation. Oikos 37:306-312.

Harrison, S.P., G.D. Jones, P.H. Schumann, J.W. Forster y P. Young (1988) Variation in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii sym plasmids and the association with the effectiveness of nitrogen fixation. J. General Microbiol. 134: 2721-2730.

Hartl, D.L. y D. Khnizen (1984) The population genetics of Escherichia coli. Ann. Rev. Genet. 18:31-68

Hassan, G., B. Hernández y O. Focht (1986) Comparison of Hup trait and intrinsic antibiotic resistance for assessing rhizobial competitiveness axenically and in soil. Appl. Environm. Microbiol. 51: 546-551

Hedrick, P. (1983) Genetics of populations Science Books International. Boston. 629 pag.

Holben, W.E. y J.M. Tiedje (1988) Applications and nucleic acid hybridization in microbiol ecology. Ecology 69:561-568.

Hua, S.S., V. Tsai, G.M. Lichens y A.T. Norma (1982) Accumulation of aminoacids in Rhizobium spp strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. Appl. and Environm. Microbiol. 44:135-140

Hutchington, G.E. (1954) The biogeochemistry of terrestrial atmosphere. En: Kuiper G.P (Ed) Earth as a planet Chicago Press, Chicago pp 371-433

Jackson, M.L. (1982) Análisis químicos de suelos 4a ed. Omega, Barcelona. 661 pag.

Jenny, H. (1980) The soil resource. Sringel-Verlag Nueva-York 376 pag.

Kalusta, G. y D. Rouwenhorst (1973) Influence of inoculum size on Rhizobium japonicum serogroup distributon frequency in soybean nodules. Agronomy J. 65:916-919.

Kamicker, B.J. y W.J. Brill (1986) Identification of Bradyrhizobium japonicum nodule isolates from Wisconsin soy bean farms. Appl. Environm. Microbiol. 51:487-492.

Kaplan, L. (1965) Archeology and domestication in american Phaseolus (beans). Econ. Bot. 19:358-368.

Kaplan, L. (1981) What is the origin of the common bean? Econ. Bot. 35:240-254.

Kijne, J., G. Smith, C. Diaz y B. Lugtenberg (1988) Lectin-enhanced accumulation of manganese limited Rhizobium leguminosarum cells on pea root hair tips. J. Bacteriol. 170:2994-3000.

Kram, A., y W.J. Broughton (1981) Rhizobia in tropical legumes. IX. Pot and field trials with inoculants for Psophocarpus tetragonolobus. Soil Biol. Biochem. 12:203-209.

Krebs, Ch. (1978) Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance 2a. Ed. Harper & Row. Nueva

York. 150-206 pp.

Lakshni-Kimari, M., C.S. Singh y N.S. Subba Rao (1974) Root hair infection and nodulation of lucerne as influenced by salinity and alkalinity. Plant and Soil 40:261-268.

Lawson, K., Y. Barnett y C. Mc Gilchrist (1987) Environmental factors influencing numbers of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii and its bacteriophages in two field soils. Appl. Environm. Microbiol. 53:1125-1131.

Lewonting, R.C. y J.L. Hubby (1966) A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics 54:595-609.

Lieberman, M., R. Zablutowicz y N. Davis-Omholt (1986) Improved method of typing Bradyrhizobium japonicum in soybean nodules Appl Environm. Microbiol. 51:715-719.

Manly, B. (1985) The statistics of natural selection on animal populations Chapman & Hall. Londres 150-196 pp.

Maréchal, R., J.M. Mascherpa y F. Stainier (1978) Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de donnés morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. Boissiera 28:1-263.

Marshall, K.C. (1964) Survival of root-nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. Aust. J. of Agric. Res. 15:273-281.

Martínez-Romero, M.E. (1985) Reiteración de las secuencias de nitrogenasa y especificidad de Rhizobium para nodular y fijar nitrógeno en Phaseolus vulgaris. Tesis para obtener el grado de Doctor en investigación biomédica básica, UNAM, UACP y P del CCH, CEFINI.

May, R. (1979) Patterns of species abundance and diversity. En: Ecology and Evolution of Communities Cody, M. y Diamond, J. (Eds) The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge. 81-121 pp.

Mc Dade, J.E. y V.F. Newhouse (1986) Natural history of Rickettsia rickettsii. Ann. Rev. Microbiol. 40:287-309.

Mc Loughlin, T.J., L.M. Bordeleau y L.K. Dunican (1984) Competition studies with Rhizobium trifolii in a field experiment. J. Appl. Bacteriol. 56:131-135.

Meade, J., P. Higgins y F. O'Gara (1985) Studies on the inoculation and competitiveness of a Rhizobium leguminosarum strain in soils containing indigenous rhizobia. Appl. Environm. Microbiol. 49:899-903.

Milkman, R. (1973) Electrophoretic variation in Escherichia coli from natural sources. Science 182:1024-1026.

Milkman, R. (1975) Allozyme variation in E.coli of diverse natural origins En:Isozymes Vol. IV. Morkert, C.L. (Ed) Academic Press. Nueva York. 273-285 pp.

Miller, J.G. (1988) Living in the environment 5a. Ed. Wadsworth Publishing Company. California 188-207 pp.

Miranda-Colin, S. (1967) Origen de Phaseolus vulgaris L. (frijol común) Agrociencia 1:99-109.

Miranda-Colin, S. (1979) Evolución de Phaseolus vulgaris y P. coccineus. En: Engleman M.E. (Ed.) Contribuciones al conocimiento del frijol (Phaseolus) en México. Colegio de Postgraduados Chapingo Mex. pp. 83-101.

Moawad, H.A., W.R. Ellis y E.L. Schmith (1984) Rhizosphere response as a factor in the competition among three serogroups of indigenous Rhizobium japonicum for nodulation of field grown soybeans Appl. Environm. Microbiol. 47: 607-612.

Mulongoy, K., A. Ayanaba y E. Pulver (1981) Exploiting the diversity in the cowpea-rhizobia symbiosis for increased cowpea production. En: Emejuaue, S.O. Ogambi, O. Sanni, S.O. (Eds). Global impacts of applied microbiology sixth International Conference. Academic Press. Londres. 119-125 pp.

Musser, J.M., U.J. Rapp y R.K. Selander (1987a) Clonal diversity in Haemophilus pleuropneumoniae. Infection and Immunity 55:1207-1215.

Musser, J.M., D.A. Bemis, H. Ishikawa y R.K. Selander (1987b) Clonal diversity and host distribution in Bordetella brochiseptica. J. Bacteriol. 169:525-537.

Musser, J.M., D.A. Bemis, H. Ishikawa y R.K. Selander (1988) Clonal diversity and host distribution in Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 171:529-537

Nabhan, G.P., A.M. Rea, K.L. Reichhardt, E. Mellin, y Ch. Hutchinson (1982) Papago influences on habitat and biotic diversity: Quitovac oasis ethnoecology. J. Etnobiol. 2:124-143.

Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic

distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press Nueva York. 512 pag.

Nei, M., F. Tajima y Y. Tatenno (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. J. Mol. Evol. 19:153-170.

Nevo, E. (1978) Genetic variation in natural population: Patterns and theory. Theor. Populat. Biol. 13:121-177.

Osa-Afiana, L.O. y M. Alexander (1982) Effect of moisture on the survival of Rhizobium in the soil. Soil Sci. Soc. of Am. J. 43:925-930.

Peña-Cabriales, J.J. y M. Alexander (1979) Survival of Rhizobium in soils under drying. Soil Sci. Soc. Am. J. 43:962-966.

Pianka, E. (1973) The structure of lizard communities. Ann. Rev. Ecol. Syst. 4:53-74.

Pielou E.C. (1975) Ecological diversity A Willey-Interscience Publication. Nueva York, 165 pag.

Piñero, D., E. Martínez y R.K. Selander (1988) Genetic diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. Appl. Environm. Microbiol. 54: 2825-2832.

Polhill, R.M., P.H. Raven y C.H. Sturton (1981) Evolution and systematics of leguminosae. En: Polhill, R.M. y P.H. Raven (Eds) Advances in Legume Systematics IV University Press. 245-287 pp.

Porter, K. (1988) Cell sorting techniques for microbial ecology. Ecology 69:558-560.

Ramshaw, J.A.M., J.A. Coyne y R. C. Lewonting, (1979) The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variation. Genetics 93:1019-1037.

Richards, B.N. (1987) The microbiology of terrestrial ecosystems Logman Scientific & Technical, Inglaterra. 399 pag.

Robert, F.M. y E.L. Schmidt (1985) Somatic serogroups among 55 strains of Rhizobium phaseoli. Can. J. Microbiol. 31:519-523.

Roth, R.R. y W.D. James (1988) Microbial ecology of the skin. Ann. Rev. Microbiol. 42:441-464.

Schlegel, H.G. y D. Vollbrecht (1980) Formation of the deshydrogenases for lactate ethanol and butanediol in the strictly aerobic bacterium Alcaligenes eutrophus. J. Gen. Microbiol. 117:475-481.

Schmidt, E.L. (1974) Quantitative autoecological study of microorganism in soil by immunofluorescence. Soil Sci. 118:141-149.

Selander, R.K. y B.R. Levin (1980) Genetic diversity and stucture of Escherichia coli populations. Science 210:545-547.

Selander, R.K., R.M. Mc Minney, T.S. Whittam, W.F. Bibb, D.J. Brenner, F.S. Nolte y P.E. Pattinson (1985) Genetic structure of populations of Legionella pneumophila. J. Bacteriol. 163: 1021-1037.

Selander, R.K., D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour y T.S. Whittam (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environm. Microbiol. 51:873-884.

Selander, R.K., D.A. Caugant y T.S. Whittam (1987) Genetic structure and variation in natural populations of Escherichia coli. En:Ingraham J.L. (Ed.) Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology A.S.M. Publications. Washington. D.C. 3-20 pp.

Singleton, P.W., S.A. El Suvarfy y B.B. Bohlool (1982) Effect of salinity on Rhizobium growth and survival. Appl. and Environm. Microbiol. 44:884-890.

Smith, D.C. y A.E. Douglas (1987) The biology of symbiosis Edward Arnold. Londres, 302 pag.

Smith, G., J. Kyne y B. Lugtenberg (1986) Correlation between extracellular fibrils and attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hair tips. J. Bacteriol. 168: 821-827.

Smith, G., Kyne, J. y Lugtenberg, B. (1987) Involvement of both cellulose fibrils and Ca²⁺ dependent adhesin in the attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hair tips. J. Bacteriol. 169: 4294-4301.

Stanton, N.L. (1988) The underground in the grasslands. Ann. Rev. Ecol. Syst. 19:573-589 .

Subba Rao, N.S. (1984) Interaction of nitrogen fixin microorganisms with other soil organisms. En: Subba Rao, N.S

(Ed.) Biological Nitrogen Fixation. Edward Arnold Londres. pp. 37-64 .

Tateno, Y., M. Nei y F. Tajima (1982) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. J. Mol. Evol. 18: 387-404.

Tiedje J.M., R.K. Colwell, Y. L. Grossman, R.E. Hodson, R. E. Lensky, R. N. Mack y P.J. Regal (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recomendations. Ecology 70:298-315.

Trang, K.M. y J. Giddens (1980) Shading and temperature as environmental factors affecting growth nodulation and symbiotic N₂ fixation by soybeans. Agronomy J. 72:305-308.

Vavilov N.I. (1949) The origin, variation immunity and breeding of cultivated plants. Chronica Botanica 13: 1-6.

Vincent, J.M. (1980) Biology of Rhizobium En: Newton, W.E. y V. H. Orme Johnson (Eds.) Nitrogen Fixation. Vol II. University Park Press. Baltimore Maryland. pp. 103-129.

Vitousek, P.M., L.R. Walker, L.D. Whiteaker, D. Mueller-Dombois y P.A. Matson (1987) Biological invasion by Myrica faya alters ecosystem development in Hawaii. Science 238:802-804.

Webster C.C. y P.N. Wilson (1980) Agriculture in the tropics Longman, Londres 256 pag.

Young, J.P.W. (1985) Rhizobium population genetics: Enzyme polymorphism in isolates from clover, beans and lucerne grown at the same site. J. General Microbiol. 131:2399-2408.

Young, J.P.W. (1987) Rhizobium population genetics: Enzyme polymorphism in Rhizobium leguminosarum from plants and soil in a pea crop. Appl. Environm. Microbiol. 53:397-402.

Young, J.P.W., L. Demetriou y R.G. Apte (1987) Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in Rhizobium leguminosarum from plants and soil in a pea crop. Appl. Environm. Microbiol. 53:397-402.

Young, J.P.W. y M. Wexler (1988) Sym Plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of Rhizobium leguminosarum. J. General Microbiology 134:2731-2739.

Young, J.P.W. y A.W.B. Johnston (1989) The evolution of specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. Trends in Ecol. and Evol. 4:341-349.

Zablotowicz, R.M., D.L. Eskew y D.D. Focht, (1978) Denitrification in Rhizobium. Canad. J. of Microbiol. 24:757-760.

ANEXO 1

TECNICAS QUE SE UTILIZARON EN ESTE ESTUDIO

1.-MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS

A) MEDIO SOLIDO PEPTONA-LEVADURA (PY)

PEPTONA DE CASEINA-----5 gr
EXTRACTO DE LEVADURA-----3 gr
AGAR-----15 gr
AGUA DESTILADA-----1 lt

Esta solución se esteriliza por 20 minutos a 2 atmósferas y antes de vaciarla en las cajas de petri se le anade 10 ml de solución stock de cloruro de calcio 0.7M.

B) MEDIO LIQUIDO PEPTONA-LEVADURA (PY)

PEPTONA DE CASEINA-----5 gr
EXTRACTO DE LEVADURA-----3 gr
AGUA DESTILADA-----1 lt

Se toman 150 ml de esta solución y se esteriliza en matraces de 250 ml, una vez estéril se le agrega a cada matraz 1.5 ml de solución stock de cloruro de calcio 0.7M.

2.-SISTEMAS BUFFER PARA ELECTROFORESIS DE ENZIMAS BACTERIANAS (Selander et al., 1986)

A) BUFFER TRIS CITRATO (PH=8)

CHAROLA

TRIS-----83.20 gr
ACIDO CITRICO MONOHIDRATADO---33.09 gr
AGUA DESTILADA-----1.00 lt

GEL

Se diluye el buffer de charola a una proporción 1:29

B) BUFFER TRIS-CITRATO (PH=6.7)

CHAROLA

TRIS-----27.00 gr
ACIDO CITRICO MONOHIDRATADO---18.07 gr
AGUA DESTILADA-----1.00 lt

Se ajusta el pH a 6.3 con NaOH

GEL

TRIS-----0.90 gr
 ACIDO CITRICO MONOHIDRATADO---0.63 gr
 AGUA DESTILADA-----1.00 lt

Se ajusta el pH a 6.7 con NaOH

3.-SOLUCIONES DE TINCION PARA LAS DIVERSAS ENZIMAS* (Selander et al., 1986)

*Estas recetas estan elaboradas para tenir dos geles

TABLA 1

SOLUCIONES STOCK PARA LAS TINCIONES

| SOLUCION | REACTIVOS | AGUA DESTILADA |
|---|---|----------------|
| TRIS 0.2 M (PH=8) (tris hydrochloride) | TRIS-----24.20 gr | 1000 ml |
| MTT (dimethylthiazol tetrazolium) | MTT-----1.25 gr | 100 ml |
| PMS (phenazine methosulfate) | PMS-----1.00 gr | 100 ml |
| NAD | NAD-----1.00 gr | 100 ml |
| NADP | NADP-----1.00 gr | 100 ml |
| CLORURO DE MAGNESIO | MgCl ₂ .6H ₂ O-2.03 gr | 100 ml |
| DL-ACIDO MALICO | 268 gr | 1000 ml |
| DL-ACIDO ISOCITRICO | 2.94 gr | 100 ml |
| a-/b NAFTIL ACETATO | 1.00 gr | 100 ml* |
| FOSFATO DE SODIO (PH 7) | | |
| mezclar partes iguales de: | NaH ₂ PO ₄ ---27.6 gr | 1000 ml |
| | Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O-53.6 gr | 1000 ml |
| diluir la mezcla en una proporcion 1:25 de agua destilada | | |

* ACETONA EN LUGAR DE AGUA DESTILADA

A)MALATO DESHIDROGENASA (MDH) BUFFER RECOMENDADO: TRIS PH 6.7

ACIDO MALICO-----12 ml
 TRIS-----100 ml
 MTT-----2 ml
 PMS-----1 ml
 NAD-----4 ml

B)XANTINO DESHIDROGENASA (XDH) BUFFER RECOMENDADO: TRIS PH 6.7

HIPOXANTINA -----0.2 gr

TRIS-----100 ml
NAD-----4 ml
PMS-----1 ml
MTT-----2 ml

C) ISOCITRATO DESHIDROGENASA (IDH) BUFFER RECOMENDADO: TRIS PH 8

ACIDO ISOCITRICO-----4 ml
TRIS-----100 ml
MgCl₂-----4 ml
NADP-----2 ml
MTT-----2 ml
PMS-----1 ml

D) 3-HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA (HBD) BUFFER RECOMENDADO: TRIS PH 6.7

ACIDO HIDROXIBUTIRICO-----0.2 gr
TRIS-----100 ml
MgCl₂-----4 ml
NAD-----4 ml
PMS-----1 ml
MTT-----2 ml

E) 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA (6-PGD) BUFFER RECOMENDADO TRIS PH 6.7

ACIDO FOSFOGLUCONICO-----0.02 gr
TRIS-----50 ml
MgCl₂-----20 ml
NADP-----2 ml
PMS-----2 ml

F) GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6P) BUFFER RECOMENDADO TRIS PH 8

GLUCOSA 6-FOSFATO-----0.2 gr
TRIS-----100 ml
MgCl₂-----2 ml
NADP-----2 ml
PMS-----1 ml
MTT-----2 ml

G) PEPTIDASAS (PEP) BUFFER RECOMENDADO TRIS PH 8

O-DIANISINA-----0.02 gr
LEU-ALA-----0.04 gr
PEROXIDASA-----0.02 gr
VENENO SERPIENTE (V7000)--0.02 gr
TRIS-----100 ml
MnCl₂ 0.25 M-----1 ml

H) ESTERASAS (EST1 Y EST2) BUFFER RECOMENDADO TRIS PH 8

NAFTIL ACETATO-----3 ml
FOSFATO DE SODIO-----80 ml
FAST BLUE RR SALT-----0.05 gr