



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO.

TESO1000146288

TAXONOMIA Y FILOGENIA DE CEPAS DE
Rhizobium leguminosarum.

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor
en Investigación Biomédica Básica
presenta

LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA

Cuernavaca, Morelos.

Enero de 1991.

A Martha,
A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer en primera instancia a Esperanza Martínez por su asesoría constante e infallible durante el tiempo que duró este doctorado y por la confianza que mostró por mí.

A los Drs. Daniel Piñero, Guillermo Dávila y Rafael Palacios por su seguimiento y apoyo como parte del comité Asesor.

A los Drs. Xavier Soberón, Jorge Soberón, Gloria Soberón (no relation) y Carmen Gomez por haber aceptado ser sinodales.

A todos mis amigos y cuates: Marco, Mario(s), José, Mónica, Victor, Toño, Juan, Ismael, Maluye, el Terrón, Oswaldo, Susi y David, Alejandro(s), Laura, Amparo, Lupe, Carolina, Pati(s), Pancho, Jaque, Miguel, y algunos otros.

A todos mis alumnos.

Al CIFN, por los diversos apoyos que me brindaron.

A Alejo por todas las fotografías, las bandas que se vieron y manchas que no se vieron.

A todos los que olvidé.

Sistemática bacteriana.

Los microbiólogos de finales del siglo XIX y principios del siglo XX se interesaron tanto como los botánicos y zoólogos en determinar las relaciones evolutivas existentes entre bacterias. Sin embargo la búsqueda de la filogenia bacteriana fué inicialmente un fracaso. Los animales y las plantas tienen muchos detalles morfológicos los cuales sirvieron de base para su clasificación taxonómica, mientras que la morfología de las bacterias es tan sencilla que no sirve para clasificarlas. Las características fisiológicas de las bacterias han permitido una mejor clasificación, sin embargo aunque se puedan agrupar especies bacterianas usando rasgos fisiológicos compartidos, existen especies emparentadas que carecen del rasgo en cuestión (Fox, 1980). Debido a esta situación se llegó a crear un esquema evolutivo tan distorsionado que en vez de resolver problemas los hizo mas confusos (el ejemplo más conocido es el de Pseudomonas, uno de los grupos bacterianos más estudiados, el cual es realmente una colección de 5 grupos diferentes de bacterias) (Fox, 1982). El estudio de la evolución bacteriana quedó estancado hasta que se desarrolló la secuencia de ácidos nucleicos, esta técnica le ha dado un nuevo aliento al problema de la filogenia bacteriana. Actualmente se pueden determinar las relaciones filogenéticas mucho más sencillamente y con mucho más detalle y profundidad. El campo de la microbiología está a tal grado inundado por la información de secuencia obtenida que la captura y el análisis de esta información se ha

vuelto un verdadero problema, cuando el determinar la secuencia en sí ha dejado de serlo. Desgraciadamente, el análisis y las conclusiones filogenéticas no dejan de ser oscuros para la mayoría de los microbiólogos lo cual les hace desconfiar de ellas. Sin embargo las filogenias obtenidas a partir de las secuencias nucleotídicas deben ser tomadas por lo que son: hipótesis de trabajo para ser probadas o desechadas a la luz de otros tipos de datos (Jensen, 1985).

Filogenia bacteriana.

El primer punto a discutir es si las bacterias tienen o no una filogenia, es decir si las bacterias tienen una genealogía, una historia única. Esta duda surge del momento que está muy bien documentada la transferencia horizontal de información genética entre bacterias, ya sea mediada por plásmidos, fagos o por transformación genética. Alguna función puede haber evolucionado en un organismo en particular y posteriormente ser transferida horizontalmente a otro distinto. El análisis de estas secuencias daría arboles filogenéticos distorsionados ya que reflejarían la historia de la secuencia en particular y no la del conjunto del genoma del organismo. Esto podría llegar al grado de que el intercambio de genes entre especies fuera tan grande que las bacterias no tuvieran una historia propia sino que fueran, en palabras de Woese, "una quimera evolutiva, una colección de genes, cada uno con su historia" (Woese, 1987). Comparando las filogenias obtenidas con secuencias de rRNA16s

y de citocromo c en el grupo de las bacterias púrpuras, se encontró que las filogenias observadas con cada secuencia no eran marcadamente diferentes entre sí lo cual indica que estas secuencias al menos no han estado involucradas en eventos de transferencia horizontal. Por lo tanto se puede proponer con cierta seguridad que las bacterias tienen en principio una historia genética propia, es decir una filogenia, y que está registrada por algunos de los cronómetros evolutivos de la célula, pese a que no se conozca aún la fracción y la identidad de las funciones de una célula que pudieran participar en la transferencia interespecífica de genes.

El segundo punto por discutir es si la taxonomía de las bacterias es comparable a la de los metazoarios en el sentido que los árboles filogenéticos pueden ser divididos en taxones naturalmente y que los grupos encontrados se coloquen a su vez en estructuras jerárquicas sencillas. Por el momento no parece ser siempre este el caso ya que pocos son los conjuntos de bacterias que pueden ser agrupados por propiedades fenotípicas particulares comunes a todos los miembros. Por ejemplo, aunque las bacterias gram-positivas, definidas por la estructura de su pared celular, forman un clado, este también incluye bacterias que no tienen paredes celulares gram-positivas. Una explicación a estas aparentes inconsistencias es que aún no se han buscado las características fenotípicas que realmente son comunes a bacterias pertenecientes a un mismo grupo filogenético.

Los análisis moleculares han permitido ver la extensión del

árbol filogenético de todos los seres vivos (ver Fig 1.). La primera observación es que aunque esté representado en una forma arraigada (es decir que existe un ancestro común a todas las ramas), no se conoce cual es el punto en la estructura que corresponde realmente al ancestro universal, el organismo del cual todas las formas vivas existentes derivaron, aunque debe encontrarse entre el dominio Bacteria y los otros. La característica más sobresaliente de este árbol es la separación tan clara de los dominios primarios. Todos los miembros de un dominio se parecen más entre sí que a cualquier miembro de otro dominio. Recientemente Woese y colaboradores (1990), propusieron la separación de todos los seres vivos en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (antes conocidos como Eubacteria, Archeobacteria y Eukariota). Esto responde al agrupamiento observado haciendo comparaciones de secuencias, a diferencia de los arreglos observados con características fenotípicas (por ejemplo el arreglo de los cinco reinos de Whittaker (Whittaker, 1959, Whittaker y Margulis, 1978): Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera o la dicotomía de la separación eucariote-procariote de Chatton (1938). Dentro de la propuesta de Woese se plantea una división formal entre los miembros del dominio Archaea en dos reinos: Euryarchaeota compuesto por las metanógenas y sus parientes, formando un grupo fenotípicamente heterogéneo, y Crenarchaeota compuesto por las termoacidófilas o eocitas, formando un grupo fenotípicamente homogéneo que ocupa nichos enteramente termófilos. Esta

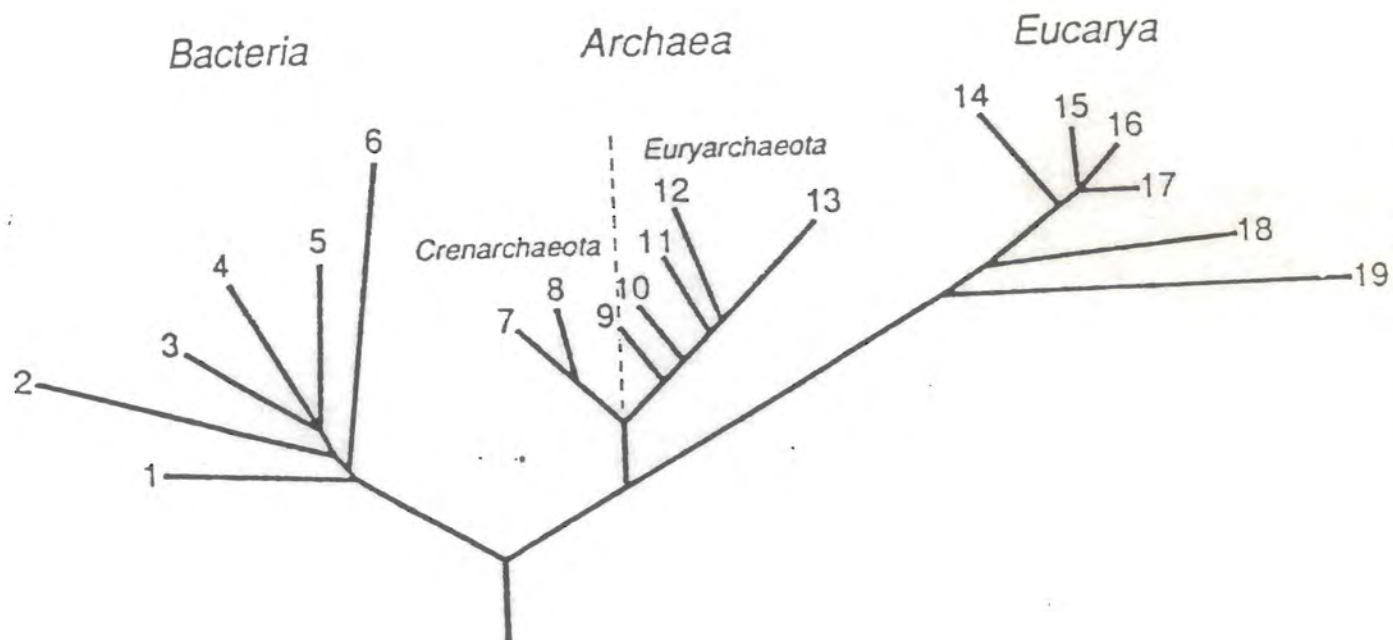


Fig. 1. Arbol filogenético universal mostrando los tres dominios y algunos de los reinos propuestos por Woese y col. (1990). La posición relativa de las ramas fué definida por el análisis de rRNA 16s. La posición de la raíz fué inferida de un análisis de genes parálogos (genes que divergieron el uno del otro antes de la separación de los dominios).

característica es común a los dos grupos por lo que se puede suponer que es un fenotipo ancestral del dominio Archaea. De la misma manera se propone la elevación a nivel de reinos de los diferentes phyla del dominio Bacteria, ya que representan divisiones filogenéticas muy profundas, y en el dominio Eukarya la conservación de los reinos Plantae, Animalia y Fungi pero la división del reino Protista en varios reinos correspondientes a los diferentes linajes protistas (ver figura 1).

Se ha caracterizado el rRNA de más de 500 especies de bacterias, encontrándose que las bacterias se separan en grupos naturalmente definidos. Algunos taxa definidos por las secuencias de rRNA pueden también ser identificados por características fenotípicas comunes, que en la mayoría de los casos sólo son comunes en alguno de los miembros del taxón pero no a su totalidad.

El dominio Bacteria está actualmente dividido en los siguientes grupos: Termotogales, Flavobacterias y parientes, Cianobacterias, Bacterias Púrpuras (con cuatro subdivisiones, alfa, beta, gama y delta), Bacterias Gram-positivas y Bacteria verdes no-sulfurosas.

Determinación de las relaciones filogenéticas bacterianas.

La información genotípica tiene más ventajas que la información fenotípica, la base clásica de la clasificación taxonómica. La información de secuencia puede ser interpretada más sencilla, rápida y precisamente y es per se más informativa en

cuanto a las relaciones evolutivas que la información fenotípica. Los elementos de una secuencia, nucleótidos o aminoácidos, están restringidos en número y bien definidos. La subjetividad de determinar la igualdad o similitud a nivel fenotípico es reemplazada por juicios más sencillos, por ende más objetivos, y por relaciones matemáticamente definidas. Por ejemplo, se puede considerar a una molécula cuya secuencia cambia al azar en el tiempo como a un cronómetro. La cantidad de cambios en la secuencia es el producto de la velocidad de fijación de mutaciones por el tiempo transcurrido. Sin embargo no se puede medir el cambio de un estado original a un estado final ya que el estado original ya no existe, por lo tanto se utiliza el hecho que dos o más versiones de una secuencia encontradas en dos o más organismos existentes provienen de un ancestro común. Las diferencias encontradas entre estas secuencias serían aproximadamente el doble (asumiendo una velocidad de fijación de mutaciones comparable en las dos) de las diferencias adquiridas por cada organismo desde que tuvieron un ancestro común. Para ser usadas como cronómetro evolutivo es necesario que una secuencia cumpla con las siguientes condiciones: comportamiento de reloj en el sentido que los cambios deben ser proporcionales al tiempo (los cambios deben ser lo más azarosos posible), las velocidades de cambio deben corresponder al espectro de las distancias evolutivas que se quieren determinar (debe haber zonas de relativa constancia y zonas más variables, algo así como manecillas de horas, minutos y segundos) y por

último la molécula debe ser lo bastante grande como para proveer la información necesaria y contribuir a un funcionamiento regular del reloj evolutivo (la zona debe ser lo bastante grande para garantizar que no haya limitaciones en lo azaroso de la aparición de mutaciones).

Algunas de las moléculas más utilizadas en la actualidad para determinar filogenias son los RNA ribosomales. Son moléculas que muestran un alto grado de constancia funcional, lo cual garantiza un buen funcionamiento como reloj evolutivo. Se encuentran en todos los organismos, y diferentes zonas de la molécula cambian a velocidades muy diferentes lo cual permite determinar hasta las relaciones filogenéticas más distantes. Su tamaño varía entre 1.5 y 3 Kb aproximadamente y contienen un gran número de dominios (existen alrededor de 50 asas en la estructura secundaria del rRNA 16s) involucrados en la funcionalidad de la molécula.

Definición de especie bacteriana.

La genética de poblaciones es el estudio de la variación dentro de las especies, la sistemática el de las diferencias entre especies. Estas disciplinas están separadas por los límites de la especie y cada una tiene su definición para ésta. La sistemática define una especie en función de características fenotípicas como serían resistencias intrínsecas a antibióticos, utilización de diferentes fuentes de carbono, etc. En el caso de la genética de poblaciones la definición es genética,

se basa en el flujo génico y se puede resumir en la definición de una especie biológica de Mayr: " una comunidad reproductiva de poblaciones (reproductivamente aislada de otras) que ocupa un nicho específico en la naturaleza " (Mayr,1982). Las bacterias presentan dos problemas para esta definición, el primero es su reproducción predominantemente asexual y el otro la aparente promiscuidad de algunos elementos genéticos.

Al tener una reproducción asexual, cada cepa de bacteria podría constituir, según la definición anterior, una especie independiente ya que se encuentra aislada genéticamente de otras cepas. Cada vez que se fija una mutación en cualquier gene de una bacteria se estaría haciendo en realidad una especie nueva. Los estudios de genética de poblaciones, por ensayos de electroforesis de alelos, llevados a cabo en bacterias, principalmente en Escherichia coli, han mostrado que la diversidad genética es mucho más alta que en eucariotes (el 90% de los loci son variables en bacterias cuando sólo el 30% lo son en eucariotes, el promedio de alelos por locus es tres veces mayor en bacterias que en eucariotes). Por otra parte existe una asociación muy fuerte entre alelos (desequilibrio de ligamiento), esto indica una muy baja frecuencia de recombinación de manera que la estructura genética de la población es esencialmente clonal. Por último, los diferentes aislados de E.coli se agrupan en tres conjuntos, los cuales representarían a los tres linajes evolutivos principales. Shigella, original-

mente considerada como una especie aparte, resultó ser en realidad parte de E. coli, al observarse que sus aislados se agrupan con dos de los tres conjuntos de cepas de E.coli. La diversidad genética también resultó ser local, las diferencias entre sitios geográficos contribuye muy poco a la diversidad total de la especie (esto quiere decir que toda la diversidad genética observable en una especie se puede encontrar en una colección aislada en un solo sitio, no hay especies con adaptaciones geográficas). Todo esto pone en duda la equivalencia biológica de la unidad taxonómica de E.coli con una especie eucariótica.

Existen múltiples ejemplos de transferencia horizontal entre bacterias, basta mencionar la adquisición de resistencias a antibióticos por una multitud de cepas. Este tipo de ejemplos han llevado a muchos autores a suponer que no deben existir especies biológicas de bacterias y por lo tanto no se puede esperar tener un árbol evolutivo coherente. Las bacterias pudieran compartir una poza común de genes de la cual cualquier "especie" podría tomar genes en función de su utilidad (Hedges, 1972), y por ende las relaciones filogenéticas se presentarían como una retícula compleja más que como un árbol ramificado. Por otra parte los genetistas de poblaciones y evolutivos han considerado que la transferencia interespecífica de genes no ha jugado un papel importante en lo que a genes cromosomales se refiere. Como mencioné anteriormente, el desequilibrio de ligamiento observado indica que la recombinación genética que

podiera existir es demasiado baja como para romper las asociaciones entre alelos (Milkman, 1988). Sin embargo al comparar los árboles filogenéticos de alelos de dos loci muy cercanos (gnd y rfb) en E.coli, se observa que los árboles no son coherentes el uno con el otro (Dykhuizen, 1986). Asimismo al analizar la secuencia nucleotídica de genes que codifican para resistencia a penicilina (proteínas que se pegan a penicilina, PBP) en estafilococos, se observa que el gene en sí se parece mucho más a sus homólogos en otras especies que otros genes aledaños. La mejor explicación a estos hechos es que éstas incoherencias filogenéticas sean el producto de una recombinación, en un caso intraespecífica y en el otro interespecífica. Sin embargo, la transferencia ocasional de genes o de trozos de genes y su incorporación por recombinación específica no sería suficiente para romper el desequilibrio de ligamiento observado (la clonalidad) pero mantendría la cohesividad genética de la especie.

Una de las consecuencias directas de la transferencia horizontal de información genética es la posible existencia de tipos intermedios entre especies, por lo tanto las especies podrían estar separadas arbitrariamente más que separadas naturalmente. Al estudiar aislados de E.coli y de Salmonella typhimurium uno observa que todos los aislados de E.coli se parecen mucho más entre ellos que a cualquier Salmonella, tanto por criterios de hibridación de DNA total como por criterios fenotípicos. Al comparar los mapas genéticos de los cromosomas

de ambas especies se observa que existe una gran colinearidad entre ellos, es decir que la localización relativa de los genes en cada especie es la misma salvo unas cuantas excepciones. De la misma manera, al compararse la secuencia nucleotídica de diferentes genes se observa que son muy similares entre las dos especies. Sin embargo, cuando se transfiere DNA de E.coli a cepas de Salmonella se observa que se integra en el cromosoma a mucho menor frecuencia que el DNA proveniente de transferencias intraespecíficas. La imagen que queda de las poblaciones de bacterias es la de un grupo compuesto por líneas genéticamente aisladas y por otras líneas involucradas en mayor o menor grado en eventos de recombinación. La carencia de límites perfectamente definidos de una especie hace que exista una incertidumbre en cuanto al nivel de diferencias necesarias para distinguir una especie de otra. Por ejemplo, se han clasificado a casi todas las variantes serológicas de Salmonella como especies diferentes cuando por otra parte grupos completos de bacterias han sido agrupados en misceláneas obviamente mal clasificadas como Pseudomonas. Una proposición que ha surgido es la separación de las especies en función del grado de homología a nivel de DNA. Todos los aislados que muestran una homología mayor del 70% y una $T_m(e)$ menor a 5°C se deberían clasificar como pertenecientes a una misma especie (Johnson, 1984). El problema que acarrea este tipo de proposiciones es que no funciona siempre tan claramente, ya que aunque se puedan separar las enterobacterias muy fácilmente con estos criterios,

algunas bacterias que establecen asociaciones tanto patógenas como beneficiosas con plantas (Pseudomonas o Rhizobium) forman grupos claros donde el nivel de homología de DNA puede ser tan sólo de 50-60%.

Solo se han clasificado una pequeñísima parte de las bacterias existentes por lo tanto no se puede descartar aún la existencia de tipos intermedios. La división de las bacterias en grupos puede ser debida al desconocimiento de las formas intermedias.

Taxonomía de Rhizobium: un ejemplo de problema.

La familia Rhizobiaceae.

Las bacterias de la familia Rhizobiaceae se caracterizan por su capacidad de interaccionar con plantas superiores; de tal manera, Agrobacterium tiene la capacidad de formar tumores en plantas y los miembros de los generos Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium pueden establecer una simbiosis con las raíces de leguminosas. Los pasos principales de esta simbiosis consisten en el reconocimiento planta-bacteria, el proceso de infección de las células corticales de la raíz, el desarrollo de una estructura altamente diferenciada llamada nódulo, producto de la diferenciación tanto de las células vegetales como de las bacterias. Las bacterias llevan a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico, reduciéndolo a amonio, el cual es exportado a la planta. Esta, a su vez, provee de fuentes energéticas provenientes de la fotosíntesis.

Estudios recientes de las filogenias obtenidas con secuencias

TABLA 1. LA FAMILIA RHIZOBIACEAE (según Jordan, 1984)

Género	Especie	Planta Hospedera
Rhizobium	meliloti	Alfalfa y Trigonella
	leguminosarum	
	biovar viciae	Chicharo
	biovar trifolii	Trébol
	biovar phaseoli	Frijol
	loti	<u>Lotus</u>
	galegae	<u>Galega</u> sp.
	fredii	Soya
	xingiangensis	Soya
	Bradyrhizobium	japonicum
Azorhizobium	caulinodans	Sesbania
Agrobacterium	tumefaciens	Diversas
	rhizogenes	dicotiledóneas
	rubi	
	radiobacter	ninguna
Philobacterium		

del gen del rRNA 16s de cepas de Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium muestran que estos géneros son muy diferentes entre sí (P. Young, en prensa). Las cepas de Rhizobium se agrupan con Agrobacterium, Rochalimea quintana y Brucella abortus (estos últimos son patógenos de animales) cuando las cepas de Bradyrhizobium y de Azorhizobium se agrupan con Rhodobacter sphaeroides y Methylobacterium (fig. 2). Estos datos ponen en duda la organización actual de la familia de las Rhizobiaceae.

Las especies han sido definidas principalmente en base a características fenotípicas como son el rango de huéspedes, la morfología colonial, el crecimiento en medios de cultivo selectivos y algunas características metabólicas. En Rhizobium, la mayoría de los genes que controlan la nodulación, la especificidad de huésped y la fijación de nitrógeno se encuentran localizados en plásmidos de alto peso molecular, llamados plásmidos simbióticos. Estos plásmidos pueden ser transferidos por conjugación a otras bacterias confiriéndoles la capacidad de establecer una simbiosis efectiva (Martínez, 1987).

Las especies de rhizobium.

La taxonomía actual de las Rhizobiaceae se encuentra en la tabla 1. Lo primero que cabe resaltar es que la división en especies claramente responde al huésped de cada bacteria, éste es un carácter exclusivamente fenotípico. Sin embargo también se puede observar que tanto R. fredii como R. xingiangensis son

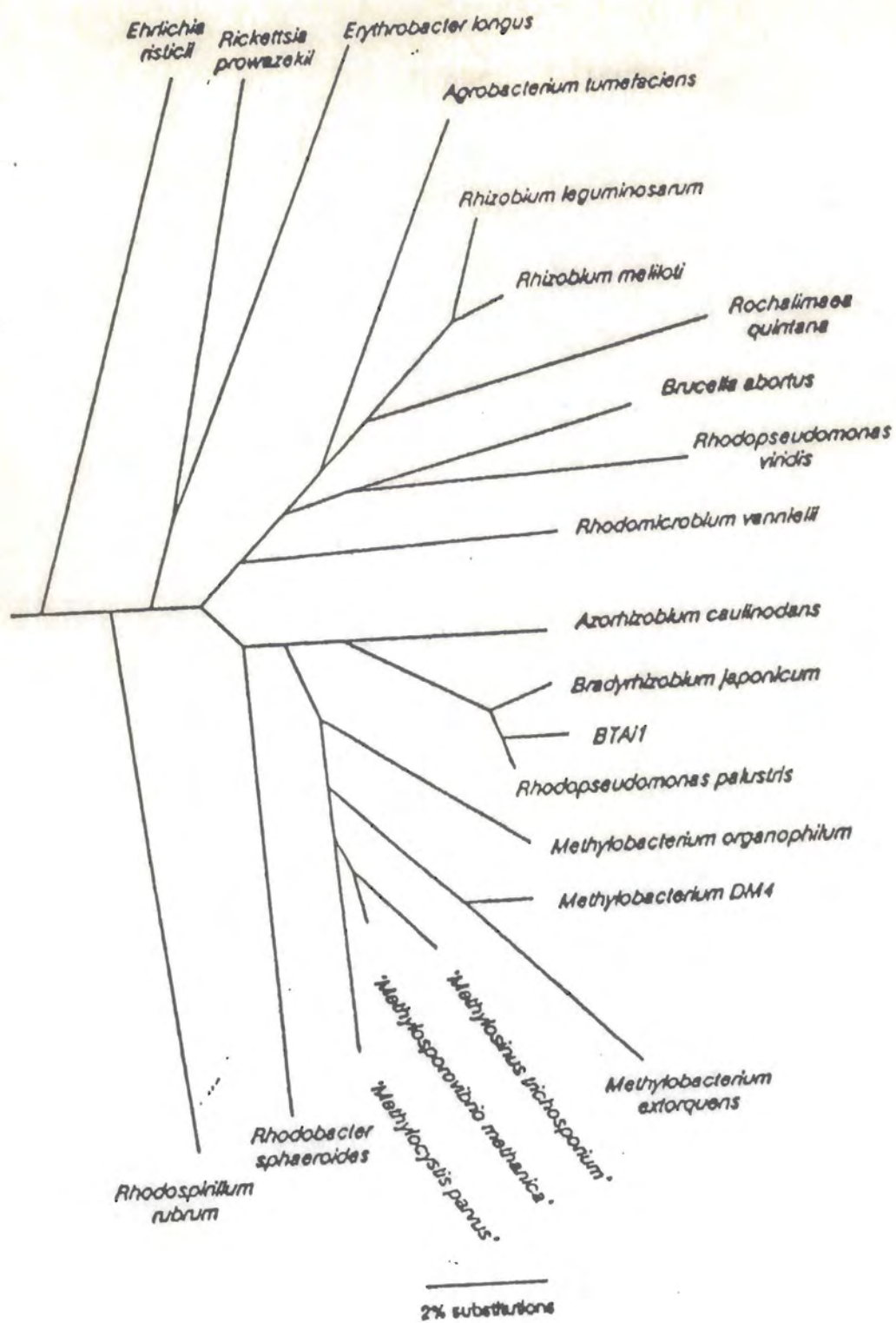


Fig. 2. Arbol filogenético mostrando la filogenia de las Rhizobiales propuesta por Young *et al.* (en prensa). La posición relativa de las ramas fué definida por el análisis de la secuencia de un fragmento del rRNA 16s obtenido por PCR.

capaces de establecer una simbiosis con la soya al igual que las bacterias de la especie Bradyrhizobium japonicum (otro género de la misma familia). Por otra parte, bacterias pertenecientes a una sola especie, R. leguminosarum, pueden establecer una simbiosis con tres huéspedes totalmente diferentes, el frijol, el chícharo y el trébol en función del biovar al que pertenecen, phaseoli, viciae y trifolii respectivamente. Estudios muy recientes de Eardly et al. (1990) mostraron que la especie R. meliloti también puede ser dividida en dos tipos claramente distintos que reconocen variedades distintas de alfalfa, una cultivada y la otra perenne. Por último, R. galegae reconoce a dos especies de plantas del mismo género, Galega officinalis y G. orientalis. Datos recientes obtenidos por comparación de secuencias de rRNA 16s muestran que R. fredii, simbiote de la soya, tiene una secuencia idéntica a la de R. meliloti, simbiote de la alfalfa. Una cepa no clasificada hasta ahora, la NGR234, la cual tiene la capacidad de establecer una simbiosis efectiva con 19 especies de plantas pertenecientes a cinco familias también resultó tener una secuencia idéntica a la de R. meliloti (P. Young, comunicación personal).

Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli.

Las bacterias que establecen una simbiosis con las raíces del frijol, Phaseolus vulgaris L., han sido clasificadas como pertenecientes a R. leguminosarum bv. phaseoli. Estas han sido divididas en dos tipos, I y II, los cuales muestran las

siguientes características:

- Las bacterias del tipo I tienen un rango estrecho de nodulación ya que establecen una simbiosis exclusivamente con el frijol. Tienen reiteraciones de los genes que codifican para la nitrogenasa, enzima responsable de la fijación de nitrógeno; se determinó que la secuencia nucleotídica de los tres genes nifH es idéntica. Los genes comunes de nodulación tienen un arreglo particular, el gen nodA se encuentra separado de los genes nodBC formando dos unidades transcripcionales distintas aunque con una regulación coordinada (M. Vázquez et al., 1991). Se describió un gen, psi, involucrado en la regulación de la producción de polisacáridos el cual sólo se encuentra en el plásmido simbiótico de estas bacterias tipo I.

- Las cepas del tipo II tienen una copia única de los genes de la nitrogenasa y son además capaces de establecer una simbiosis con árboles de Leucaena, una leguminosa tropical. La organización de los genes comunes de nodulación es la de un operón nodABC, tal como ha sido descrito en otras bacterias de los generos Rhizobium y Bradyrhizobium (Vargas et al., 1990). Se ha descrito la presencia de un gen cuyo producto está involucrado en la producción de una auxina, el ácido indolacético, en la cepa tipo II CFN299. Las cepas que llevan mutaciones en este gen inducen un número reducido de nódulos en las raíces de sus huéspedes aunque estos son normales (Pardo et al., 1990). Se ha descrito la presencia de secuencias similares al gen involucrado en la producción de auxinas en todas las bacterias del tipo

II analizadas cuando las bacterias del tipo I carecen de señales similares (E. Martínez, sin publicar).

Piñero et al. demostraron en un estudio de la estructura genética de R. leguminosarum bv. phaseoli por análisis electroforético de alelos que los dos tipos eran claramente diferenciables a nivel de cromosoma.

Desde hace algún tiempo se sabe que, en R. leguminosarum, las cepas que pertenecen a alguno de los biovares difieren principalmente en el tipo de plásmido simbiótico que poseen, ya que como se mencionó anteriormente los genes de especificidad de huésped residen en este elemento genético. Se han realizado experimentos en el laboratorio donde se han intercambiado los plásmidos simbióticos de cepas de diferentes biovares observándose un cambio concomitante de rango de huésped. La transferencia de plásmidos entre cepas parece ser un fenómeno bastante común en Rhizobium, aunque la frecuencia parece ser mucho más baja en el suelo que en el laboratorio (Broughton et al., 1987). Su ocurrencia natural ha sido substanciada por inconsistencias en el agrupamiento de cepas usando genotipos plasmídicos o genotipos cromosomales (Kaijalainen, 1989).

Inestabilidad de la información simbiótica.

Se ha observado la pérdida a alta frecuencia de la capacidad simbiótica en el laboratorio. Esta pérdida está relacionada a la curación del plásmido simbiótico en algunas cepas y en otras corresponde a la delección en este plásmido de un fragmento que tiene parte de la información genética necesaria para estable-

cer la simbiosis.

Se ha descrito el aislamiento a partir de suelo de cepas de Rhizobium carentes de información simbiótica. Soberón et al. a través de una selección en medios y temperaturas diferenciales de crecimiento aislaron cepas con un comportamiento de crecimiento similar a cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli tipo I. Jarvis et al. aislaron bacterias del suelo carentes de información simbiótica por hibridización con DNA total proveniente de una cepa de R. leguminosarum bv. trifolii. En ambos casos, al introducir por conjugación un plásmido sim se observó que estos aislados no-simbióticos adquirirían la capacidad de establecer una simbiosis efectiva con el huésped correspondiente. Se han aislado también bacterias no-simbióticas por inmunodetección en colonia utilizando un anticuerpo monoclonal específico para R. leguminosarum bv viciae, estas bacterias comparten patrones específicos de isozimas con bacterias aisladas de nódulos (P. Young, comunicación personal).

Objetivos de este trabajo.

El primer objetivo de esta tesis fué determinar la estructura genética de una población de aislados no-simbióticos y su relación con aislados simbióticos bona fide pertenecientes a diferentes especies de Rhizobium por electroforesis multilocus de enzimas. Este análisis permite determinar si se trata propiamente de cepas de R. leguminosarum no-simbióticas o en realidad de una especie diferente cercanamente emparentada. Este trabajo fué aceptado para publicación en la revista Applied and Environmental Microbiology de la ASM bajo el título "Genetic structure of a soil population of non-symbiotic Rhizobium leguminosarum".

El segundo objetivo fué determinar la taxonomía de las cepas pertenecientes al tipo II y su relación con las cepas del tipo I. Piñero et al. determinaron la estructura genética de una colección de aislados de nódulos de frijol y de Leucaena. Esta colección estaba compuesta en su mayoría por cepas del tipo I pero también incluía cepas del tipo II. Se encontró en este trabajo y en el anterior que las bacterias del tipo II formaban siempre un grupo claramente separado y distante de las bacterias del tipo I. Esto era indicativo de que se trataba de dos grupos claramente diferentes de bacterias. Para determinar su posición taxonómica se determinó la estructura genética de una colección de aislados silvestres de cepas tipo II también por electroforesis multilocus de enzimas. Este análisis fué completado por taxonomía numérica de 118 características

bioquímicas. Este trabajo ha sido sometido para su publicación en el International Journal of Bacterial Systematics de la ASM bajo el título "Two novel Rhizobium species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp trees".

Dentro del desarrollo de ambos trabajos se implementaron técnicas moleculares para estudios de genética de poblaciones. Montamos las condiciones para secuenciar productos de doble cadena de PCR. Este método permite la obtención prácticamente directa de secuencias de interés. En particular hemos secuenciado fragmentos del gen que codifica para el rRNA 16S para determinar las relaciones filogenéticas existentes entre organismos.

Parte de estos análisis se encuentran reseñados en los artículos incluidos en este trabajo. Recientemente, hemos analizado cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli tipo I basándonos en la estructura genética descrita por Piñero et al. Estos resultados adicionales se encuentran descritos al final.

Genetic Structure of a Soil Population of Nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*

LORENZO SEGOVIA,^{1*} DANIEL PIÑERO,² RAFAEL PALACIOS,¹ AND ESPERANZA MARTINEZ-ROMERO¹

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos,¹ and Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510 D.F.,² Mexico

Received 9 August 1990/Accepted 14 November 1990

The genetic structure of a population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* strains was determined by the electrophoretic mobilities of eight metabolic enzymes. Nonsymbiotic strains were isolated from the rhizosphere of bean plants and characterized by growth on differential media and at different temperatures, intrinsic antibiotic resistances, the lack of homology to a *nifH* probe, and their inability to form nodules on bean roots. All the isolates clustered with *R. leguminosarum* bv. phaseoli reference strains and did not encompass any other *Rhizobium* taxa. Their rRNA operon restriction fragment length polymorphisms and the nucleotide sequence of a fragment of the 16S rRNA gene were also found to be identical to those of *R. leguminosarum* bv. phaseoli reference strains. When complemented with an *R. leguminosarum* bv. phaseoli symbiotic plasmid (p42d), the nonsymbiotic isolates were able to fix nitrogen in symbiosis with bean roots at levels similar to those of the parental strain. The symbiotic isolates were found at a relative frequency of 1 in 40 nonsymbiotic *R. leguminosarum* strains.

The bacteria of the family *Rhizobiaceae* are characterized by their ability to interact with higher plants; thus, *Agrobacterium* spp. are able to form tumors on plants and *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, and *Azorhizobium* spp. can establish a symbiosis with the roots of legumes. These species have therefore been defined primarily on the basis of phenotypic characteristics such as by host range, colony morphology, growth on selective media, and certain metabolic attributes (14). The only exception to this rule is *Agrobacterium radiobacter*, which does not elicit any kind of cortical hypertrophy in plants but shares many of the chromosomal characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* (14).

In *Rhizobium* spp., most of the genes controlling nodulation, host range specificity, and nitrogen fixation are located on large transferable plasmids called sym plasmids. In *Rhizobium leguminosarum* these plasmids can be lost spontaneously at a high frequency and can also undergo frequent rearrangements, resulting in loss of the symbiotic capacity (14, 23).

The isolation of nonsymbiotic *Rhizobium* strains from soil has been described previously. Soberón-Chávez and Nájera (24) and Jarvis et al. (9) isolated strains from soil that are chromosomally similar to *R. leguminosarum*. Both groups reported that when complemented with a sym plasmid, these isolates were able to establish an effective symbiosis with the host plant as determined by the plasmid.

In the present study, we isolated nonsymbiotic bacteria by using growth on selective media, growth at specific temperatures, and intrinsic antibiotic resistances as selection criteria. The genetic relatedness of the nonsymbiotic isolates to different *Rhizobium* strains was determined by multilocus enzyme electrophoresis and corroborated by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the rRNA operons. We sequenced a fragment of the 16S rRNA gene of three nonsymbiotic isolates and found that the sequences

were identical to that of a symbiotic *R. leguminosarum* bv. phaseoli strain. We then transferred an *R. leguminosarum* bv. phaseoli sym plasmid to eight nonsymbiotic isolates belonging to different phylogenetic clusters. The transconjugants acquired the capacity to establish an effective symbiosis with bean plants.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Reference strains are listed in Table 1. Cells were grown in the following media: peptone yeast medium (PY) (17), yeast mannitol medium (YM), and minimal medium with lactose as the carbon source (MM-Lac; 10^{-7} g of $\text{FeCl}_3 \cdot \text{ml}^{-1}$, 2.3% [wt/vol] K_2HPO_4 , 1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5% CaCl_2 , 1% NH_4NO_3 , 0.2% lactose). When indicated, the following antibiotics were added: kanamycin ($30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), spectinomycin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), nalidixic acid ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), and cycloheximide ($150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Isolation of soil bacteria. Six-week-old nodulated bean plants were harvested from a field in Tepoztlán, Morelos, Mexico. Beans have been cultivated at that site for the last 50 years in rotation with maize and without the addition of fertilizers. The root systems of 10 plants were placed in 50-ml sterile culture tubes containing 25 ml of a mixture of 10 mM MgSO_4 and 0.01% (vol/vol) Tween 40. Tubes were allowed to stand at room temperature for 30 min and then were vortexed for 10 min. The root system was then removed, and the suspension was left to sediment for 1 h. Aliquots (0.1 ml) were plated on PY containing nalidixic acid and cycloheximide and on MM-Lac containing nalidixic acid and cycloheximide. The plates were incubated at 30°C until colonies appeared (72 h). A total of 2,000 isolates from the MM-Lac plates and 500 from the PY plates were tested for their abilities to grow at 37°C in PY and MM-Lac and at 30°C in LB medium. Only 295 strains which grew exclusively at 30°C on PY and MM-Lac were preserved. These isolates were found at different frequencies on MM-Lac and PY (14 and 3%, respectively). They were further analyzed for their

* Corresponding author.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Nonsymbiotic isolates		This study
CFN401 to CFN478		
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type I		
VS001 to VS010	Wild type	V. Souza ^a
CFN42	Wild type	CFN ^b
CFN3	Wild type	CFN
CFN285	Wild type	CFN
BRA8	Wild type	CFN
VikingI	Wild type	E. Schmidt ^c
Nitragin-8251	Wild type	Nitragin ^d
CFNX78	Tn5 insertion on p42d	S. Brom ^b
CFN2001	CFN42 derivative cured of sym plasmid (p42d)	CFN
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli type II		
CFN299	Wild type	CFN
CIAT899	Wild type	P. Graham ^c
C05-35	Wild type	M. Tsai ^e
C05-II	Wild type	M. Tsai
UMR1063	Wild type	P. Graham
AD822	CIAT899 derivative cured of sym plasmid	B. Ben Bohloo ^f
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae		
USDA2337	Wild type	USDA ^g
USDA2434	Wild type	USDA
USDA2443	Wild type	USDA
USDA2479	Wild type	USDA
USDA2489	Wild type	USDA
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii		
USDA2046	Wild type	USDA
USDA2048	Wild type	USDA
USDA2152	Wild type	USDA
<i>R. meliloti</i>		
SU47	Wild type	J. Dénarié ^h
Rme2	Wild type	J. Dénarié
Rme7	Wild type	J. Dénarié
GR037	Wild type	M. Megías ⁱ
GR4	Wild type	M. Megías
<i>R. loti</i>		
NZP2037	Wild type	K. Marcker ^j
<i>S. fredii</i>		
USDA191	Wild type	USDA
USDA193	Wild type	USDA
USDA214	Wild type	USDA
HH003	Wild type	M. Sadowsky ^c
HH103	Wild type	M. Sadowsky
<i>A. tumefaciens</i>		
C58	Wild type	M. van Montagu ^k
A348	Wild type	E. Nester ^l
<i>E. coli</i>		
HB101		1
Plasmids		
pCQ152	<i>nifH</i> probe	20
pKK3535	rRNA operon probe	3
pRK2013	Mobilization helper	23
cos309	30-kb chromosomal fragment from CFN42	17

^a Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.^b Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.^c Department of Soil Science, University of Minnesota.^d Nitragin Co., Milwaukee, Wis.^e Universidade de Sao Paulo, 13400 Piracicaba, CP 36 Brazil.^f NiFTAL Project, Paia, Hawaii.^g USDA Beltsville *Rhizobium* Culture Collection, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705.^h Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, CNRS-INRA, Castanet, Tolosan 31326, France.ⁱ Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla.^j Department of Molecular Biology and Plant Physiology, University of Aarhus, 8000 Aarhus C, Denmark.^k Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit, B9000, Gent, Belgium.^l Department of Microbiology and Immunology, University Washington, Seattle, WA 98115.

AUTHOR:
SEE QUERY
PAGE 5, 6, 7, 8

ability to produce mucous growth on YM plates and to produce yellow coloring in YM-0.0025% bromothymol blue (YM-BB) plates; 90% of the isolates produced mucous growth on YM, and only 27% produced a yellow coloring on YM-BB, as did control *R. leguminosarum* bv. phaseoli CFN42 and CFN285. We selected 85 isolates for further analysis.

Preparation of lysates. Isolates were grown overnight on an orbital shaker at 200 rpm in 30 ml of PY at 30°C. Cells were harvested by centrifugation at $7,500 \times g$ for 10 min at 4°C. After suspension in 2 ml of 10 mM MgSO₄, the bacteria were sonicated twice for 30 s with a 30-s rest in an MSE sonifier with a microtip at 50% pulse; ice cooling was used during the procedure. The lysates were then stored at -70°C.

Multilocus enzyme electrophoresis. Starch gel electrophoresis and the selective staining of enzymes were done as described by Selander et al. (21). The following enzymes were assayed: alcohol dehydrogenase, NAD-malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, xanthine dehydrogenase, leucine dehydrogenase (LDH1), lysine dehydrogenase, and indophenol oxidase. The electrophoretic buffer system for all enzymes was Tris citrate (pH 8) (22), except that for LDH2, the borate (pH 8.2) system was also used. Some species (all except *R. leguminosarum*) gave a much better reaction under these conditions. LDH electromorphs (ETs) were determined in both kinds of gels and were considered to be isozymes, not alleles, depending on the buffer system used.

Distinctive mobility variants (ETs) of each enzyme, numbered in order of decreasing anodal mobility, were equated with alleles at the corresponding structural gene locus, and the ET patterns were considered to be multilocus genotypes (Table 2).

From allele frequencies for ETs, the genetic diversity for an enzyme locus was calculated as

$$h = (1 - \sum x_i^2) [n/(n - 1)]$$

where x_i^2 is the frequency of the i^{th} allele and n is the number of ETs. The Mean genetic diversity per locus (H) is the arithmetic average of h values for the nine loci (22). The genetic distance between each pair of ETs was estimated as the proportion of loci at which dissimilar alleles occurred (mismatches); clustering from a matrix of pairwise genetic distances was performed by the UPGMA method of Nei and Li (16).

Filter blot hybridization. DNA purification, digestion, and hybridization procedures were carried out as described by Flores et al. (7). The presence of *nifH* in the isolates was determined by hybridization of *EcoRI* digests of total DNA blotted on nylon membranes and probed with plasmid pCQ152, which carries a 0.3-kb *SalI* fragment of the *R. leguminosarum* bv. phaseoli CFN42 *nifHa* gene (20).

Derivatives were traced and verified by their cos309 *EcoRI* RFLP; the cos309 carries a 30-kb chromosomal fragment of strain CFN42 cloned in the *EcoRI* site of cosmid pLAFR1 (17).

The RFLPs of the rRNA operons were determined by hybridization of total DNA *Sau3A* digests probed with plasmid pKK3535 (3). This plasmid carries a 7.5-kb *BamHI* fragment containing the *Escherichia coli* *rmB* operon cloned in plasmid pBR322.

Relative levels of hybridization were estimated by using a modification of the Southern blot procedure as follows. DNA concentration was estimated spectrophotometrically at 260 nm. Total DNA digested with *EcoRI* was electro-

phoresed in 1% agarose gels, and DNA amounts in gels were further verified by transmittance scanning densitometry of acetate photographs. DNA was blotted on nylon filters and hybridized at 65°C with [³²P]DNA at high specific activity (10⁸ cpm/μg). Autoradiography was carried out overnight at -70°C, and then filter lanes were cut and counted in a Beckman scintillation counter. The percentage of total homologous recombination was calculated for each strain tested.

Nucleotide sequence of 16S rRNA genes. The nucleotide sequence of the 16S rRNA genes was determined by directly sequencing double-stranded polymerase chain reaction products with Sequenase 2 (U.S. Biochemical Corp.). A region of 491 bp corresponding to nucleotides 872 through 1363 of the *A. tumefaciens* 16S rRNA gene was amplified by using the GenAmp DNA Amplification Reagent Kit (Perkin-Elmer Cetus) with a 28-mer (CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA) and a 30-mer (CTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGA) as primers. The reaction was carried out as specified by the manufacturer in 30 temperature cycles as follows: 30 s at 95°C for denaturation, 30 s at 55°C for primer annealing, and 3 min for polymerization at 72°C. The polymerase chain reaction products were purified by using QIAGEN Tip 20 minicolumns and the method suggested by the manufacturer. Direct sequencing with Sequenase was carried out by the method of Casanova et al. (5).

Transfer of the *R. leguminosarum* bv. phaseoli p42d *ym* plasmid to nonsymbiotic isolates. Spontaneous Sp^r derivatives of the nonsymbiotic isolates were used as recipients in triparental matings with strain CFNX78 as the p42d donor and *E. coli* HB101(pRK2013) as the mobilization helper (2, 23). Transconjugants were selected by their ability to grow on PY containing spectinomycin, kanamycin, and nalidixic acid. The transconjugants were authenticated by their *nifH* and cos309 RFLPs.

Bean nodulation and nitrogen fixation assays. Bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa) nodulation assays and nitrogen fixation determination by the acetylene reduction assay were carried out as described previously (13).

RESULTS

Identification of nonsymbiotic *R. leguminosarum*. Soil bacteria were isolated from the rhizosphere of bean plants and characterized by growth on differential media and at different temperatures. A total of 85 isolates having similar growth characteristics to a wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli type I strain were chosen. The selected strains were examined by Southern hybridization for their ability to hybridize to a nitrogenase reductase-specific (*nifH*) probe (pCQ152). Only 2 of the 85 strains showed any homology to the *nifH* probe. These two strains proved to be *R. leguminosarum* bv. phaseoli, as they were able to nodulate and fix nitrogen in symbiosis with bean plants (data not shown). The other 83 strains did not nodulate beans.

Genetic diversity of nonsymbiotic isolates. Two types of *R. leguminosarum* bv. phaseoli strains have been previously defined among strains isolated from bean nodules (2, 13), corresponding essentially to two different symbiotic plasmids. Type I strains have multiple copies of nitrogenase *nifH* genes (12, 17) and a narrow nodulation host range (2). Type II strains have a single copy of the *nif* genes and nodulate *Leucaena* spp. (2, 12). To establish whether these isolates were properly nonsymbiotic *R. leguminosarum* strains, we analyzed the genetic diversity of our sample together with

d SEGOVIA ET AL.

TABLE 2. Allele profiles at nine enzyme loci in 110 ETs

ET	No. of alleles at indicated enzyme locus ^a :								
	MDH	IDH	G6P	XDH	LDH1	LYD	LDH2	ADH	IPO
1	5	5	2	2	5	5	- ^b	5	5
2	5	5	3	2	5	5	-	5	5
3	5	5	2	3	5	5	-	5	5
4	5	5	2	1	5	6	-	5	5
5	5	5	2	2	5	6	-	5	5
6	5	4	2	2	5	7	-	5	5
7	5	6	2	4	5	4	-	5	5
8	4	4	2	1	5	6	-	5	5
9	5	4	2	1	5	6	-	5	5
10	9	4	2	1	5	5	-	5	5
11	5	4	2	1	6	5	-	5	5
12	5	4	1	1	6	6	-	5	5
13	5	4	2	1	6	6	-	5	5
14	5	4	2	3	5	6	-	6	5
15	5	4	2	2	5	6	-	6	5
16	5	2	2	1	5	6	-	6	5
17	4	4	2	2	5	6	-	6	5
18	4	4	2	2	5	5	-	6	5
19	4	7	2	2	5	5	-	6	5
20	7	4	3	2	5	5	-	6	5
21	5	5	1	2	5	5	-	6	5
22	5	5	3	2	5	5	-	6	5
23	5	5	1	2	7	5	-	6	5
24	5	4	1	2	7	5	-	6	5
25	5	6	1	2	5	5	-	5	5
26	5	4	1	2	5	5	-	5	5
27	5	4	1	2	5	5	-	6	5
28	6	6	1	2	5	5	-	6	5
29	5	5	1	1	5	5	-	6	5
30	5	5	1	1	5	5	-	4	5
31	5	9	1	1	5	5	-	6	5
32	5	6	1	1	5	5	-	6	5
33	5	5	1	1	5	6	-	6	5
34	7	5	1	1	5	5	-	5	5
35	5	5	1	1	5	5	-	5	5
36	5	5	1	1	5	4	-	5	5
37	5	6	1	1	6	6	-	6	5
38	5	6	1	1	5	6	-	6	5
39	4	6	1	1	5	6	-	6	5
40	6	5	1	2	5	6	-	5	5
41	6	5	1	2	5	6	-	6	5
42	4	5	1	2	5	6	-	6	5
43	4	5	1	2	5	4	-	5	5
44	5	4	1	2	5	6	-	6	5
45	5	4	1	2	5	6	-	5	5
46	6	4	1	2	5	6	-	5	5
47	6	4	1	2	5	6	-	6	5
48	5	4	1	2	6	6	-	6	5
49	4	4	1	1	5	5	-	7	5
50	4	4	3	1	5	5	-	7	5
51	4	4	1	1	5	5	-	6	5
52	5	4	1	1	5	5	-	5	5
53	5	4	1	1	7	5	-	5	5
54	4	4	1	1	7	5	-	5	5
55	8	4	1	1	6	5	-	5	5
56	5	4	1	1	6	5	-	7	5
57	5	5	1	1	6	5	-	7	5
58	5	7	2	1	6	5	-	7	5
59	5	4	1	3	6	5	-	6	5
60	5	4	3	1	6	5	-	6	5
61	5	4	1	1	6	5	-	6	5
62	5	4	1	1	7	6	-	7	5
63	5	5	1	3	7	6	-	6	5
64	5	5	1	2	7	6	-	7	5
65	5	5	1	2	6	6	-	7	5
66	4	5	1	1	5	6	-	7	5

Continued

TABLE 2—Continued

ET	No. of alleles at indicated enzyme locus ^a :								
	MDH	IDH	G6p	XDH	LDH1	LYD	LDH2	ADH	IPO
67	4	5	1	3	6	6	-	7	5
68	4	5	1	3	5	6	-	5	5
69	5	4	2	2	6	5	-	8	5
70	5	4	3	2	6	5	-	5	5
71	5	5	2	2	6	5	-	6	5
72	4	5	1.5	2	6	5	-	5	5
73	4	5	2	2	6	5	-	5	5
74	6	5	1	2	6	5	-	5	5
75	4	5	1	2	6	5	-	4	5
76	4	5	1	2	6	5	-	6	5
77	4	5	1	2	5	5	-	6	5
78	8	1	1	2	6	4	-	5	5
79	5	5	1	2	6	4	-	5	5
80	4	4	2	3	6	5	-	5	5
81	6	5	2	1	6	5	-	5	5
82	6	5	1	1	6	6	-	5	5
83	6	6	1	1	6	6	-	5	5
84	4	5	2	1	7	4	-	6	5
85	5	5	2	1	5	4	-	4	5
86	4	6	7	4	-	6	5	7	5
87	3	6	6	4	-	6	5	7	5
88	3	6	7	4	-	6	5	8	5
89	3	6	7	4	-	6	6	7	5
90	4	7	7	4	-	5	5	7	5
91	7	7.5	1.5	4	7	4	-	7	5
92	9	7.5	2	3	7	6	-	7	5
93	8	7	1	4	7	5	-	7	5
94	7	7	1.5	4	7.5	6	-	6	5
95	7	7	1	3	7	4	-	6	5
96	7	7	2	4	6.5	4	-	6	5
97	7	6	2	3	6.5	4	-	5	5
98	7	6	4	3	6.5	4	-	4	5
99	6	3	2	3	-	6	6	8	6
100	7	2	2	3	-	6	5	9	6
101	7	2	3	3	-	7	5	8	7
102	8	3	3	4	-	7	5	8	7
103	8	2	3	3	-	6	6	9	7
104	3	2	3	3	-	6	6	8	7
105	3	3	4	3	-	6	5	5	7
106	4	2	4	3	-	6	5	9	7
107	4	2	4	2	-	6	5	6	7
108	4	2	4	3	-	6	5	6	7
109	7	6	7	5	-	7	7	5	6
110	7	6	7	5	-	7	7	6	6

^a Abbreviations: MDH, NAD-malate dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; G6P, glucose-6-phosphate dehydrogenase; XDH, xanthine dehydrogenase; LDH1, leucine dehydrogenase in Tris citrate (pH 8); LYD, lysine dehydrogenase; LDH2, leucine dehydrogenase in the borate (pH 8.2) system; ADH, alcohol dehydrogenase; IPO, indophenol oxidase.

^b -, No detectable activity in this buffer system.

bona fide *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains. Several strains were isolates from the same field collected at the same time from nodules found on the roots of the bean plants, and others were reference strains from our collection (Table 1). To establish whether the isolates belonged exclusively to *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains or whether they could be other *Rhizobium* species, we incorporated isolates of other biovars or species: *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II (12), *R. leguminosarum* bv. viciae, *R. leguminosarum* bv. trifolii, *R. meliloti*, *R. loti*, *Sinorhizobium fredii*, and *A. tumefaciens*.

Cluster analysis of the ETs showed four defined divisions, I (ETs 1 to 85), II (ETs 86 to 98), III (ETs 99 to 108), and IV (ETs 109 and 110) (Fig. 1). All the nonsymbiotic isolates

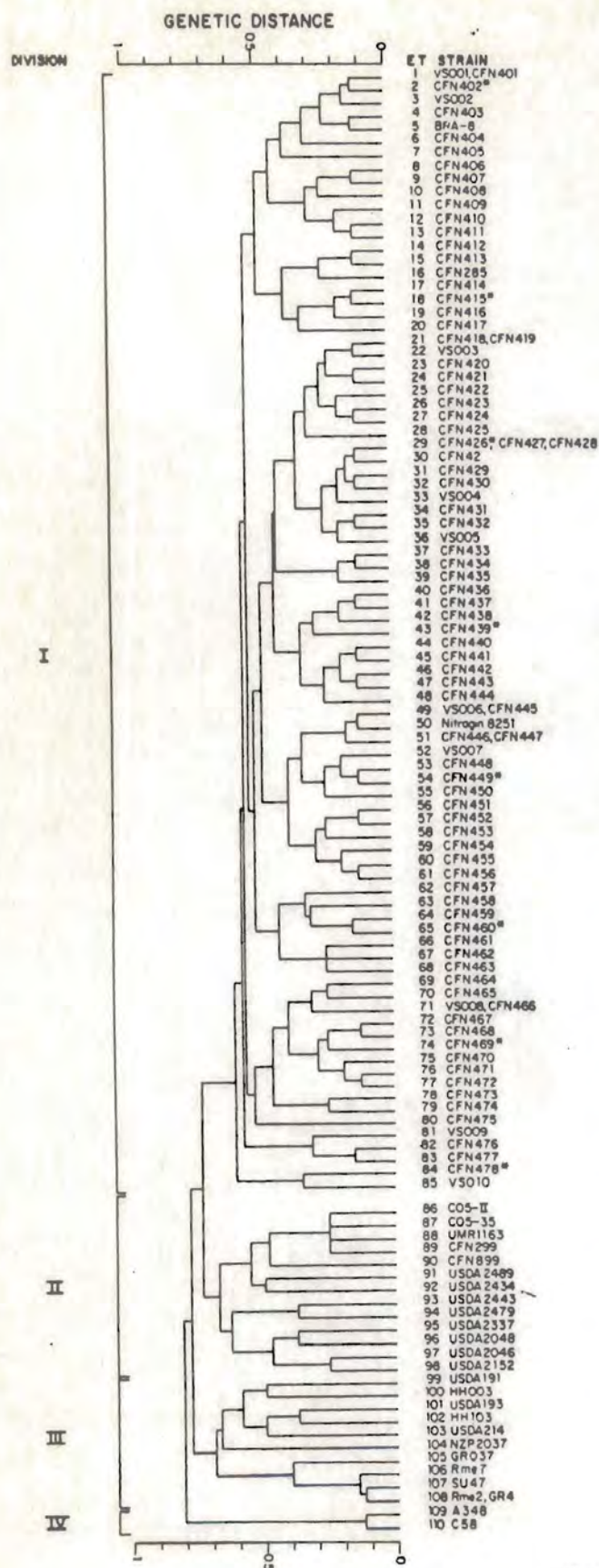


TABLE 3. Genetic diversity at nine enzyme loci among ETs

Enzyme locus ^a	Characteristics of:			
	110 ETs ^b		38 ETs ^c	
	No. of alleles	Genetic diversity (<i>h</i>)	No. of alleles	Genetic diversity (<i>h</i>)
MDH	7	0.723	6	0.592
IDH	9	0.762	7	0.558
G6P	6	0.663	4	0.525
XDH	5	0.728	4	0.589
LDH1	5	0.739	3	0.556
LYD	4	0.633	4	0.574
LDH2	3	0.978	0	-
ADH	6	0.704	5	0.643
IPO	4	0.272	1	0
Mean	5.4	0.689	4.5 ^d	0.504 ^d

^a Abbreviations are as in Table 2, footnote a.

^b Represented by the total sample of 121 isolates examined.

^c Represented by division I, the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I cluster.

^d Means were calculated without taking LDH2 into account.

were enclosed in division I with a genetic distance of 0.6. This division also included all the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains. Cluster I was separated from all the other divisions at a genetic distance of at least 0.73. The outermost group, division IV, at a distance of 0.81, was formed by the *A. tumefaciens* strains; division III, at 0.78, was composed, on one extremity, of the *R. meliloti* strains forming a tight cluster at 0.4, and on the other, the single *R. loti* strain separated 0.67 from the *S. fredii* strains in a 0.59 cluster. Division II exhibited the most diverse composition: one cluster formed by the three *R. leguminosarum* bv. trifolii strains and three of the *R. leguminosarum* bv. viciae strains at genetic distance of 0.63 divided by 0.67 of a second cluster made up of the remaining *R. leguminosarum* bv. viciae strains and the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II strains.

In this analysis, all enzymes assayed were polymorphic, with allele frequencies (*h*) ranging from 0.272 to 0.978 for indophenol oxidase and LDH2, respectively (Table 3), and a mean genetic diversity for the whole collection of $H = 0.689$, including all species. In estimations of the genetic diversity of division I only (Fig. 1), the *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli cluster, indophenol oxidase became monomorphic, as reported by Eardly et al. for *R. meliloti* (6), and LDH2 was not measurable as it was not present in this cluster (Table 3); the mean genetic diversity was $H = 0.504$, which is slightly lower than the 0.615 value found by Piñero et al. for a collection of *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains (19).

Ribosomal hybridization RFLPs. Eight nonsymbiotic isolates (strains CFN402, CFN415, CFN426, CFN439, CFN449, CFN460, CFN469, and CFN478) belonging to the main groups found on the genetic distance tree in division I were

FIG. 1. Genetic relatedness among 110 ETs of *Rhizobium* spp. and nonsymbiotic isolates based on electrophoretically detectable allelic variation at nine enzyme loci (Table 2). Strains used in rRNA operon RFLP analysis, sym plasmid transfer, and DNA relative hybridization are marked with an asterisk. I, II, III, and IV correspond to the divisions as defined in the text.

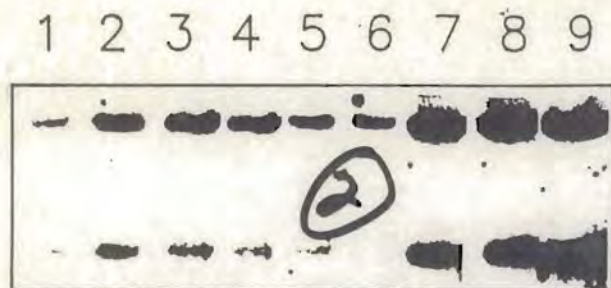


FIG. 2. Hybridization patterns of *Sau*3A-digested total DNA of eight nonsymbiotic isolates and six *R. leguminosarum* bv. phaseoli reference strains probed with plasmid pKK3535. Lanes: 1, CFN402; 2, CFN415; 3, CFN426; 4, CFN439; 5, CFN449; 6, CFN460; 7, CFN469; 8, CFN478; 9, CFNX78.

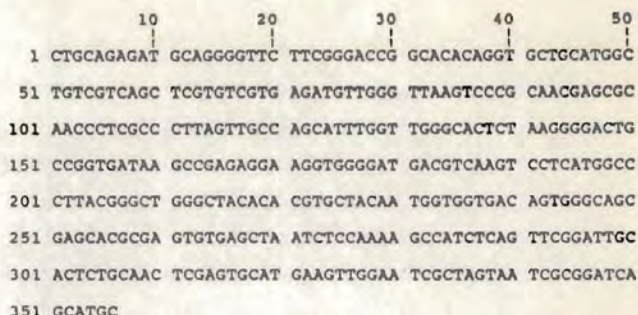


FIG. 3. Nucleotide sequence of an *R. leguminosarum* bv. phaseoli 16S rRNA gene fragment.

selected for RFLP analysis of the rRNA operons. Total DNA *Sau*3A digests were blotted and hybridized with plasmid pKK3535. The hybridization pattern found in the nonsymbiotic isolates is the same than that of *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains (Fig. 2).

Nucleotide sequence of the 16S rRNA gene. Double-stranded polymerase chain reaction products of a fragment of the 16S rRNA gene from three nonsymbiotic isolates (CFN426, CFN439, and CFN460) and from the wild-type strain CFN42 were sequenced as described in Materials and Methods. The sequenced region encompasses a zone of variation among species (15). All proved to be identical in the 356-bp sequence (Fig. 3).

DNA homology among nonsymbiotic isolates. To estimate DNA sequence similarity coefficients, we measured the total DNA homologous hybridization percentage of the eight nonsymbiotic isolates probed with ³²P-labeled total DNA from strains CFN2001 and AD822, two derivatives cured of their symbiotic plasmids belonging to *R. leguminosarum* bv. phaseoli types I and II, respectively. All the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains, as well as the nonsymbiotic isolates, have a similar relative hybridization percentage (≤59%) to strain CFN2001 (Table 4). The two *R. leguminosarum* bv. viciae and trifolii strains, USDA2337 and USDA2048, have, respectively, 48 and 49% of homology to strain CFN2001. The *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II strain CIAT899 and *R. meliloti* SU47 both have low levels of homology to strain CFN2001 (28 and 26%, respectively). All strains have low homology levels to the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II strain AD822, except for its parent strain CIAT899 (Table 4).

Symbiotic effectiveness of nonsymbiotic derivatives carrying a sym plasmid. The symbiotic plasmid of *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strain CFN42 (p42d) was transferred to spontaneous Sp^r derivatives of the eight nonsymbiotic iso-

lates in triparental matings with strain CFNX78 as the donor and *E. coli* HB101(pRK2013) as the mobilization helper.

Bean plants, four per strain, were inoculated with the transconjugants, and 2 weeks after inoculation nitrogen fixation levels were determined by the acetylene reduction assay. Under our conditions, all plants were nodulated and the levels of nitrogen fixation were comparable to those of the parental wild-type strain CFNX78 (data not shown).

To verify that the nodules had indeed been formed by the transconjugants, three nodules from each plant were surface sterilized and crushed on PY plates devoid of any antibiotic. Twenty isolated colonies from each nodule were tested for their resistances to kanamycin, spectinomycin, and nalidixic acid. All colonies tested were Sp^r, Km^r, and Nal^r. Strains were further authenticated by their *nifH* and *cos309 EcoRI* RFLPs (Fig. 4).

DISCUSSION

Genetic relatedness of the nonsymbiotic isolates. We report here the isolation from soil of a population of nonsymbiotic *R. leguminosarum* strains. These strains were selected by their ability to grow in different media (PY, YM, and MM-Lac) supplemented with nalidixic acid at 30°C and their inability to grow at 37°C or in LB medium. These are traits known to be common to all *R. leguminosarum* bv. viciae, trifolii, and phaseoli type I strains. This screening eliminates strains belonging to different *Rhizobium* species; for instance the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II strains are capable of growth at 37°C and in LB (11), some Brazilian type I isolates can also grow at 37°C but not in LB, and not all *R. meliloti* strains are Nal^r.

The genetic structure of this collection, as determined by the MLEE data, shows that the nonsymbiotic strains are clustered with the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains. The DNA sequence similarity coefficients of the nonsymbiotic strains were determined by hybridizing, under high-stringency conditions, blotted total DNA with labeled total DNA from strains cured of their symbiotic plasmids.

TABLE 4. Relative levels of DNA-DNA hybridization at 65°C^a

Source of probe	% Homology to probe source for strain ^b :															
	CFN 402	CFN 415	CFN 426	CFN 439	CFN 449	CFN 460	CFN 469	CFN 478	NIT-8251	CFN 285	BRA 8	CFN 42	USDA 2048	USDA 2337	CIAT 899	SU 47
CFN2001	65	63	84	73	69	65	60	59	77	63	62	100	49	48	28	26
AD822	15	17	18	14	15	17	18	20	16	17	20	18	25	23	100	15

^a See text for details.

^b Strain phenotypes and species are described in Table 1.

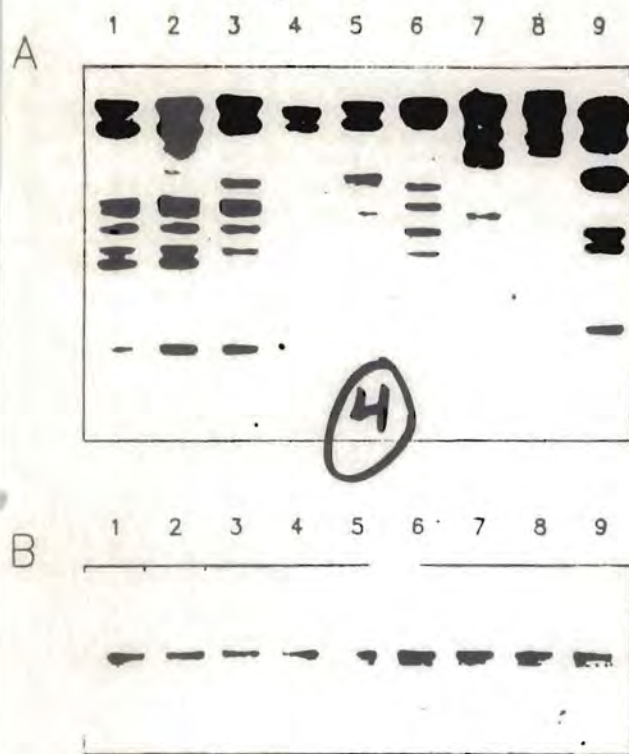


FIG. 4. RFLPs of *Eco*RI-digested total DNA of eight transconjugants of nonsymbiotic derivatives carrying the p42d sym plasmid and *R. leguminosarum* bv. phaseoli CFNX78. (A) Hybridization pattern with cos309 as the probe. (B) Hybridization pattern with pCQ152 as the probe. Lanes: 1, CFN402; 2, CFN415; 3, CFN426; 4, CFN439; 5, CFN449; 6, CFN460; 7, CFN469; 8, CFN478; 9, CFNX78.

These strains were used as probes to minimize the signals due exclusively to the sym plasmids, which would artificially enhance the hybridization levels of symbiotic strains compared with the nonsymbiotic isolates. The relative levels of homology also group the nonsymbiotic isolates with the reference *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains. These data are in accordance with previous studies of other genera of bacteria, in which it has been shown that the estimates of genetic relatedness of strains obtained by MLEE and by DNA-DNA hybridization are strongly correlated (21). Furthermore, the nonsymbiotic isolates and the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains have identical ribosomal hybridization patterns and identical nucleotide sequences in a fragment of the 16S rRNA gene. These data, taken in conjunction, strongly indicate that the nonsymbiotic isolates are indeed *R. leguminosarum*, even though they are incapable of establishing a symbiosis with the plant.

Taxonomy of *Rhizobium* species. The different divisions found in our analysis reflect the taxonomy as defined in the current *Rhizobium* systematics, apart the fact that the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type I strains seem to form a detached division from *R. leguminosarum* bv. viciae and trifolii and from *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II (12). This is supported by the observation that the most diverse group in the *R. leguminosarum* species is that of the biovar phaseoli (19). Piñero et al. found a 0.691 level of mean genetic diversity for *R. leguminosarum* bv. phaseoli, which led them to propose that this species was a polyphyletic assemblage of genetic lineages (19). The relative hybridiza-

tion levels to the *R. leguminosarum* bv. phaseoli type II strain suggest that type II strains could belong to an independent lineage from that of *R. leguminosarum* bv. viciae, trifolii, and phaseoli type I. So far, nonsymbiotic isolates have been isolated only in the last three species. It remains to be seen whether nonsymbiotic isolates belonging to other *Rhizobium* species can be isolated. For instance, the symbiotic information resides in nontransmissible megaplasmids in *R. meliloti*, and so far these have not been cured in any strain belonging to this species.

Ecological relevance of the nonsymbiotic *R. leguminosarum* strains. *Rhizobium* species are common inhabitants of soils. A measure of their adaptation is the persistence of strains in soil in the absence of their host plants.

When complemented with a sym plasmid, nonsymbiotic strains are indistinguishable from the symbiotic strains because they have the same metabolic characteristics and are capable of fixing nitrogen in symbiosis with beans (data not shown). Although the nitrogenase activities and nodule numbers are comparable to those obtained with a control strain under our laboratory conditions, we do not know whether these strains have the same competitive abilities as the natural symbiotic strains for nodulation in the soil. The generation of new symbiotic strains with new adaptative traits thus would also depend on the potential for lateral transfer of genes. Interstrain plasmid transfer seems to be a rather common phenomenon in *Rhizobium* species, although its frequency in soil seems to be much lower than that determined under laboratory conditions (4, 8). The natural occurrence of interstrain plasmid transfer is substantiated by inconsistencies found by grouping strains under plasmid genotypes defined by RFLPs and under chromosomal genotypes defined by either RFLPs or MLEE (10, 21, 26).

In our screening we found a ratio of 1 symbiotic strain to 40 nonsymbiotic strains. The true proportion may very well be higher because we cannot reject the possibility that the symbiotic strains escaped from the nodules in the roots from which we isolated our strains. This ratio could vary as a function of the time and method of sampling and the prevailing conditions in the soil.

Because the genus *Rhizobium* is defined by an ability to establish a symbiosis with the roots of legumes, nonsymbiotic isolates, although chromosomally identical, are excluded. As other authors have already pointed out, a biologically meaningful classification of the genus *Rhizobium* should be based on allelic variation in chromosomal genes rather than on plasmid-encoded phenotypes (6, 19). The inclusion of nonsymbiotic strains in the phylogeny of *Rhizobium* species provides a new framework for the understanding of the evolutionary history of the bacterium-plant interaction. To further understand the ecology of *Rhizobium* species it will be necessary to take into account the existence of these apparently abundant nonsymbiotic *Rhizobium* species and their participation in the generation of new symbiotic strains with different adaptative traits.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Guillermo Dávila for his critical discussion and encouragement throughout this study, to Ana María Valdés and Jorge Hernández Cobos for their help in adapting and running the UPGMA computer software, to Valeria Souza for her help and for providing us with strains, and to PRONASE (Productora Nacional de Semillas) for providing seeds of cultivar Negro Jamapa.

L.S. was a recipient of a doctoral studentship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Partial financial support for this research was provided by grant no. 936-5542.01-523-8.600 from the U.S. Agency for International Development.

REFERENCES

1. Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-475.
2. Brom, S., E. Martínez, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* sp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1280-1283.
3. Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148:107-127.
4. Broughton, W. J., U. Samrey, and J. Stanley. 1987. Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: symbiotic plasmid transfer in the *Medicago sativa* rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 40:251-2553.
5. Casanova, J. L., C. Pannettler, C. Jaulin, and P. Kourilsky. 1990. Optimal conditions for directly sequencing double stranded PCR products with Sequenase. *Nucleic Acids Res.* 18:4028.
6. Eardly, B. D., L. A. Materon, N. H. Smlth, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:187-194.
7. Flores, M., V. González, M. A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, D. Romero, G. Dávila, D. Piñero, and R. Palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 170:1191-1196.
8. Hoykaas, P. J. J., A. A. N. van Brussel, H. den Dulk-Ras, G. M. S. van Slotgeren, and R. A. Schilperoort. 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature (London)* 291:351-353.
9. Jarvis, B. D. W., L. J. H. Ward, and E. A. Slade. 1989. Expression by soil bacteria of nodulation genes from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1426-1434.
10. Kaljalainen, S., and K. Lindström. 1989. Restriction fragment polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *J. Bacteriol.* 171:5561-5566.
11. Martínez, E. Unpublished data.
12. Martínez, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant Soil* 108:179-184.
13. Martínez, E., R. Palacios, and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169:2828-2834.
14. Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:59-93.
15. Neefs, J. M., Y. Van de Peer, L. Hendryks, and R. De Wachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 18(Suppl.):2237-2317.
16. Nel, M., and W.-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
17. Noel, K. D., R. J. Diebold, J. R. Cava, and B. A. Brink. 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for de-novo purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 149:499-506.
18. Noel, K. D., F. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
19. Piñero, D., E. Martínez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
20. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, M. L. Girard, E. Calva, and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1170-1174.
21. Schofield, P. R., A. H. Gibson, W. F. Dudman, and J. M. Watson. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2942-2947.
22. Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:873-884.
23. Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.
24. Soberón-Chávez, G., and R. Nájera. 1989. Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information. *Can. J. Microbiol.* 35:464-468.
25. Soberón-Chávez, G., R. Nájera, H. Olivera, and L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 167:487-491.
26. Young, J. P. W., and M. Wexler. 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2731-2739.

Two novel Rhizobium species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp trees.

Running-title: New Rhizobium species from bean and Leucaena nodules.

Esperanza Martinez-Romero^{1*}, Lorenzo Segovia¹,
Fabio Martins Mercante², Avilio Antonio Franco²,
Peter Graham³, Marco Aurelio Pardo¹.

¹Departamento de Genética Molecular
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México.

²EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia
do Solo, Km 47, Seropedica 23851 Rio de Janeiro,
Brazil.

³Rhizobium Research Laboratory, Dept. Soil Sc.
University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, US.

E. Martinez
Tel.: (73)17-58-67; Telex: 173425 CIFNME
Fax: (73)17-55-81

*Corresponding author.

ABSTRACT

Two novel Rhizobium species nodulating P. vulgaris L. bean and Leucaena spp are proposed on the bases of multilocus enzyme electrophoresis, DNA-DNA hybridization, ribosomal DNA organization, partial sequence of 16S ribosomal DNA and phenotypic characteristics. Both species were up to now considered as R. leguminosarum bv. phaseoli (type II strains), and recognized by their characteristic host range (which includes Leucaena spp) and nif gene organization. In contrast to R. leguminosarum bv. phaseoli strains these new species are stable for symbiotic properties. They are tolerant to high temperatures and to acid conditions. In addition type IIB strains are naturally resistant to high levels of antibiotics and type IIA strains are non-motile bacteria.

Rhizobium species are root nodule bacteria of leguminous plants. Rhizobia nodulating pea, clover and bean (P. vulgaris L.) have been clustered in a single species called R. leguminosarum with three different biovars viciae, trifolii and phaseoli (28). These biovars seem to correspond to the different symbiotic plasmids encoding distinct nodulation specificities. Nevertheless heterogeneity in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli has been frequently reported by different criteria as protein patterns (49), antibiotic resistance (2), serological typing (48), multi-locus enzyme electrophoresis (44), DNA-DNA hybridization (11, 25), plasmid profiles (36), and exopolysaccharide structure (68).

We have previously distinguished two different types among isolates from bean nodules, and have shown that they correspond essentially to two different symbiotic plasmids (35,37,38). Type I strains have multiple copies of nitrogenase nifH genes (38,45), a narrow nodulation host range, and hybridize to the psi (polysaccharide inhibition) gene originally described in a R. leguminosarum bv. phaseoli strain (3). Type II strains have single copies of nif genes and they nodulate Leucaena spp (35,38).

Type II strains have received attention because their symbiotic plasmids promote an effective and completely differentiated symbiotic process when transferred into Agrobacterium tumefaciens recipients (5,37). Type II strains have also been found to be genetically stable, retaining their symbiotic plasmid even after prolonged incubation at high temperatures (37°C). Some are heat tolerant (30), acid and aluminum resistant (9,24,29,60). The nodulation genes from one of these strains have been cloned (62), and a sequence in type II strains involved in indoleacetic acid production is presently being characterized (unpublished). Recently, the chemical composition and structure of the extracellular polysaccharides (EPS) from one type II strain has been shown to differ from that of type I isolates (M. Megias, personal communication).

Interstrain competition for bean nodule occupancy has been tested using few type II strains in comparison to type I strains. For the conditions tested, ~~the~~ type II strains used were found to be less competitive than type I strains, in agreement to the fact that type II strains are less frequently encountered in bean nodules (38). Nodule occupancy can be enhanced under acid condi-

tions (46,61).

To define the taxonomic position of type II strains and the genetic relatedness of strains nodulating P. vulgaris we have analyzed 64 type II strains from different geographical origins and compared them to other species.

Multilocus enzyme electrophoresis has long been a standard method in systematics (43), and is perhaps the best approach in large scale studies to estimate the genetic diversity and structure of related populations (54,65,66). It provides a framework for the analysis of phenotypic characteristics and for DNA-DNA hybridization studies to further define species limits. Multilocus enzyme electrophoresis set the basis for the identification of two previously undescribed species considered among Legionella pneumophila strains (55), and also allowed the identification of a distinct group of bacteria that was previously undistinguished from R. meliloti (19). Our strategy was to first order type II strains by multilocus enzyme electrophoresis and then characterize them phenotypically. Representative strains were chosen for total DNA-and ribosomal hybridization and for 16S gene partial sequence.

Based on all criteria analyzed, we propose two new Rhizobium species, both corresponding to what we have previously described as type II strains. The proposed names are Rhizobium martinesii sp. nov for type IIA strains and Rhizobium vincentii sp. nov for type IIB strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The strains used are listed in Table 1. A number of strains are included as representative of nomen species.

Growth conditions. All cultures of Rhizobium were grown and maintained on yeast extract mannitol, YM medium (63), on peptone-yeast, PY medium (42) or in MM (17) harboring different substrates. Average duplication times were estimated by O.D recorded at 600 nm every two hours in PY medium at 30°C. Bacterial motility was tested by growing strains for two days on PY medium 0.3% agar.

Nodulation and nitrogen fixation tests on P. vulgaris cv. Carioca 80 were performed in sterilized Leonard jars with vermiculite as described (46).

Multilocus enzyme electrophoresis. Cultures derived from single colonies were grown overnight at 30°C in 50 ml PY medium. Cells were harvested by centrifugation, suspended in 1 ml of 10mM MgSO₄ and sonicated twice for 20 seconds with a 20 second rest in a MSE sonifier with microtip at 50% pulse with ice cooling. The lysates were stored at -70°C.

Procedures employed for starch-gel electro-

phoresis and activity assays of specific enzymes were as described by Selander et al (54). Eight metabolic enzymes were assayed, alcohol dehydrogenase (ADH), isocitrate dehydrogenase (IDH), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6P), xanthine dehydrogenase (XDH), indophenol oxidase (superoxide dismutase, IPO), hexokinase (HEX) and phosphoglucomutase (PGM). The electrophoretic buffer system used was Tris-citrate pH 8. Mobility variants of each enzyme were numbered in order of decreasing anodal mobility. At least five different electrophoretic assays were performed for each of the 65 strains for each enzyme tested.

Genetic diversity for an enzyme locus was calculated as $h = (1 - \sum x_i^2) / n$ where x_i^2 is the frequency of the i^{th} allele and n is the number of ETs. Mean genetic diversity per locus (H) is the arithmetic average of h values for the eight loci (54). Genetic distance between each pair of ETs was estimated as the proportion of loci at which dissimilar alleles occurred. Clustering from a matrix of pairwise genetic distances was performed by the average linkage method (56).

DNA-DNA hybridization. DNA was purified and its concentration estimated spectrophotometrically at 260 nm. Total DNA digested with EcoRI was sub-

jected to electrophoresis in 1% agarose gels and DNA quantities in gels were further verified by transmittance scanning densitometry of acetate photographs. DNA was transferred to nylon filters (57) and hybridized (21) to total EcoRI-digested DNA's from three reference strains labeled with ^{32}P by nick translation (47) at 10^8 cpm/ μg of DNA. Autoradiography was carried out at -70°C for 24 hr and then filter lanes were cut and counted in a Beckman scintillation counter. Percentage of the total homologous hybridization was calculated for each strain tested.

Ribosomal DNA hybridization. The restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of the rRNA operons were determined by hybridization of total DNA EcoRI, XhoI and HindIII digests probed with plasmid pKK3535 (7). This plasmid carries a 7.5 Kb BamHI fragment containing the E. coli rrnB operon cloned in plasmid pBR322.

Numerical taxonomy. 118 different features were analyzed. Five μl drops of freshly prepared bacterial suspensions (around 10^5 bacteria) were applied to plates containing the different substrates. Growth was recorded three and five days after inoculation. All substrates were added after filter sterilization to the minimal medium (MM),

pH7, described by Dreyfus et al (17) but omitting the vitamin solution. When substrates were tested as nitrogen sources, ammonium sulfate was not included and glucose was added at 1 g/liter. Some phenotypic characters were analyzed using PY medium instead. Plates were incubated at 30°C unless otherwise stated. The following features were considered: (i) utilization as sole carbon sources (1 g/liter) of L-alanine, L-arginine, L-aspartate, L-phenylalanine, glycine, L-glutamate, L-glutamine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-histidine, L-methionine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tyrosine, L-tryptophan, L-valine, hypoxanthine, ornithine, nopaline, octopine, α -ketoglutarate, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-glucosamine, D-glucose-6-phosphate, lactose, D-glucuronate, D-mannose, mannitol, D-ribose, sorbose, D-sorbitol, succinate, acetate, anthranilate, caseine hydrolysate, citrate, formate, isovalerate, D-malate, nicotinate, oxalate, L-tartrate, starch, sarcosine, urea, glycerol, ethanol, phenol (0.25 g/lt), methanol; (ii) utilization as sole nitrogen sources (0.5 g/lt) of ammonium sulfate, L-aspartate, glycine, L-glutamate, L-glutamine, ornithine, L-tyrosine, L-tryptophan; (iii) requirement for ascorbic acid (100 μ g/ml), biotin (100

$\mu\text{g/ml}$), folic acid (100 $\mu\text{g/ml}$), pantothenate (100 $\mu\text{g/ml}$); (iv) tolerance in MM to kasugamycin, lincomycin, oleandomycin, sulfamide, trimethoprim, each at 20 $\mu\text{g/ml}$; (v) tolerance in PY medium to carbenicillin (30 and 50 $\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol (30 and 100 $\mu\text{g/ml}$), erythromycin (100 $\mu\text{g/ml}$), gentamycin (25 $\mu\text{g/ml}$), kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$), neomycin (60 $\mu\text{g/ml}$), novobiocin (20 $\mu\text{g/ml}$), polymixin B (20 $\mu\text{g/ml}$), rifampin (50 $\mu\text{g/ml}$), spectinomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), tetracycline (1,5,10 $\mu\text{g/ml}$) and sodium hypochloride (0.12% w/v); (vi) growth on PY at 10,30, 37 and 42°C, growth on PY supplemented with NaCl at final concentrations of 1.0, 1.5 and 2%, growth on PY at pH 4,5,6,8.5 and 10.5, growth on liquid PY omitting calcium; (vii) growth on Luria broth (LB); (viii) colony morphology on PY, YM, MM with various carbon sources (ix) acid production on YM, with bromothymol blue (0.0025% w/v) as indicator. Results were analyzed by mixed method parsimony using the Wagner criterion (32).

Nucleotide sequence of 16S rRNA genes. The nucleotide sequence of the 16S rRNA genes of type I strain CFN 42, and type II strains CIAT 899, CFN 299* and UMR 1173 was determined by directly sequencing double stranded PCR products with

Sequenase 2 (USB). A region of 491 bp corresponding to nucleotides 872 through 1363 of the A. tumefaciens 16S rRNA gene was amplified using the GenAmp DNA amplification Reagent Kit (Perkin Elmer Cetus) with a 28mer (CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA) and a 30mer (CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA) as primers. The reaction was carried out according to the manufacturer with 30 cycles as follows: 30 sec at 95°C for denaturation, 30 sec at 55°C for primer annealing and 3 min for polymerization at 72°C. The PCR products were purified using QIAGEN tip 20 mini columns as indicated by the manufacturer.

Both strands of three independent double stranded PCR products from each strain tested were sequenced with Sequenase according to Casanova et al (8) using the same primers as in the amplification.

The sequences were manually aligned using the program LINEUP and their phylogenetic distances were determined using the program DISTANCES of the University of Wisconsin GCG Sequence Analysis Software Package (14). An UPGMA tree was constructed and the standard errors of branch points were determined using the UPGMA standard error program (41).

RESULTS

General features. Type II strains have many features characteristic of Rhizobium species. They are gram-negative rod-shaped bacteria of 1.5-2 μm with peritrichous flagella, nonspore-forming, that produce acid in yeast-mannitol medium. They have average duplication times of 2 hrs (type IIA) and 1:40 (type IIB) at 30°C. They have two glutamine synthetase enzymes, GSI and GSII (20) as other species in the Rhizobiaceae family (13,22). They do not produce 3-ketolactose (1), but do grow in MM-lactose and they are nalidixic acid resistant as most R. leguminosarum bv. phaseoli strains. Type II strains were isolated from effective nodules of P. vulgaris and Leucaena (Table 1). All type IIA and type IIB strains irrespective of the original host legume, nodulated P. vulgaris bean cv. Carioca 80. Some strains were as efficient as the best type I strains, while others had lower efficiency.

Multilocus enzyme electrophoresis. Type I R. leguminosarum bv. phaseoli, type IIA and type IIB strains have distinctive alleles at the loci for MDH (a very good marker clearly distinguishing these groups), and for IPO for the majority of

strains (Table 2). IIA and IIB share alleles at the HEX and PGM loci, and alleles from IIA and IIB strains show very small mobility differences at the G6P, IDH and XDH loci. ADH activity was difficult to reveal in type IIB strains but not in IIA strains in the buffer system used.

→ different species share alleles?

In E. coli, the genes coding for these metabolic enzymes seem to be chromosome borne (54). To determine their genetic location in Rhizobium we used derivatives of the type IIB strain CIAT 899, AD 4 and AD 822 lacking either the 200 or 400 Kb plasmid respectively. Identical enzyme mobility variants were obtained for all eight enzymes tested, supporting the assumption that in these strains multilocus enzyme electrophoresis allows the analysis of chromosomal rather than extrachromosomal variance.

Genetic diversity at each enzyme locus is shown in Table 3 for all the strains analyzed and for the type IIA and IIB strains. The mobility of eight metabolic enzymes was used to group the strains based on mismatch percentage between the different electrophoretic types (ET). These data were used to develop a spanning tree expressing approximate genetic distances between the ET's (Fig. 1.)

Multilocus enzyme electrophoresis clearly separated type II strains from type I strains at a genetic distance of 0.86. Type II strains are divided into two groups with a genetic distance of 0.79 between them (Fig. 1). Type IIA strains exhibit greater homogeneity than type IIB strains; the mean genetic diversity is 0.289 for the former and 0.363 for the latter. Twenty seven different type IIA strains from various geographical origins were found to be identical by the mobility of the eight metabolic enzymes tested, all of them corresponded to ET.1. The fact that IIA is less variable raises the possibility that isolates recovered from Leucaena and from bean nodules are a restricted subset of all clones of this species.

IIA and IIB species look more closely related to each other than to any other of the nomen species tested either sharing some alleles or possessing only slightly different mobility variants for half of the metabolic enzymes tested. In contrast, type II strains shared very few alleles with the small sample of type I strains tested. The latter were chosen on the basis of a shared-geographical origin with most of the type II strains tested. Type I strains have been previously reported to be an assembly of bacterial

lineages with large genetic distances between them (44). Type II reference strains CFN 299 and CIAT 899 do not cluster with any of a very broad spectrum of type I lineages as has been reported by Piñero et al. (44) and Segovia et al (53).

ET's 33,34 and 35 share some phenotypic features with IIB strains (see below) but they were not considered as clustered with type IIB strains because of the large genetic distance in between (0.78), associated to low DNA-DNA hybridization with CIAT 899 reference type IIB strain (Table 4) and differences in ribosomal gene sequence (see below).

A F_{st} index was estimated as in (44) (Table 2). High F_{st} values allow subpopulations or different populations to be distinguished, the F_{st} index for IIA is 0.519 and for IIB is 0.397, this supports the assumption that they form separated species.

DNA-DNA hybridization. IIA and IIB constitute homogeneous groups with relative high levels of DNA homology, 91.7% for IIA strains, 81.4% for IIB strains (Table 4), distinct from other Rhizobium species including R. leguminosarum bv. phaseoli as shown in Table 4. Less than 30% hybridization was obtained with either radiactively labeled CFN 299

Vulgar
(No uso que ate
Superior de correcto)

or CIAT 899 total DNA with DNA from recognized species, R. leguminosarum bv. trifolii, bv. viciae, bv. phaseoli, R. galegae (34,64), R. loti (27), R. meliloti, R. fredii (10,52), and from R. spp strains.

Ribosomal gene organization and sequence.

Fig. 2 shows the RFLP's of rRNA operons of strains CFN 42 (type I), CFN 299 (type IIA) and CIAT 899 (type IIB). The pattern obtained with type I strain is different from those of type II strains. Type IIA hybridization patterns were also different from those obtained with IIB in EcoRI, HindIII and XhoI digests (Fig. 2). Different type IIA and type IIB strains each had homogeneous patterns, the distantly related strain (ET 35) showed a distinct hybridization pattern from both IIA and IIB (not shown).

Fig. 3 shows the DNA sequences of the 16S RNA gene fragment obtained from strains CFN 42 (type I), CFN 299 (type IIA), CIAT 899 (type IIB) and UMR 1173 (type II, ET 35). To determine their genetic distances, they were aligned with the corresponding sequences of proteobacteria obtained from Genbank: Rickettsia rickettsii M21293, R. typhi M20499, R. prowazekii M21789, Agrobacterium tumefaciens M11223, Rochalimea quintana M11927

and Brucella abortus X13695. The obtained phylogenetic tree is shown in Fig. 4. The tree is in agreement with the known phylogeny of proteobacteria. The three type II strains form independent branches separated from type I strains, and these strains form a different cluster from the other Rhizobiaceae which in turn are a separated lineage from Rickettsiae. The internal phylogeny of type II strains is not clearly defined as shown by the overlapping of the standard error bars (Fig. 4). This type of overlapping is also observed in the case of the Rickettsia with three distinct closely related species, and may be explained by the small size of the sequence considered.

Phenotypic features. A total of 51 strains were characterized: 35 type II strains representing each of the ET's of type II strains and 16 strains from R. leguminosarum bvs. phaseoli, trifolii and viciae, R. meliloti, R. galegae, R. loti and R. sp NGR 234.

The following compounds were not utilized as carbon sources by any of the 51 strains tested: starch, nicotinate, oxalate, ethanol, methanol, phenol, L-methionine, L-phenylalanine, L-threonine, L-alanine, L-valine. No strain grew at PY pH 3

or 4 or on PY supplemented with NaCl 1, 1.5 and 2% NaCl. All of the strains tested grew on α -ketoglutarate, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-glucosamine, glucuronate, D-mannose, mannitol, D-ribose, L-tyrosine and L-tryptophan as carbon sources, and on L-glutamate, L-glutamine and L-tyrosine as nitrogen sources. Our results on the general utilization of carbon compounds are in accordance with the results reported by Dreyfus et al for Rhizobium strains (17). Table 5 shows some of the relevant phenotypic characteristics of the strains. The complete-linkage cluster analysis obtained by the mixed method parsimony considering 118 features is shown in Fig. 5. It is in agreement with the dendrogram derived from multilocus enzyme electrophoresis but by phenotypic characters type IIA and type IIB clusters look even more separated.

Melanine production was not considered as a phenotypic feature in our taxonomic analysis as it has been shown that it is plasmid encoded in R. leguminosarum bv. phaseoli (4) and widespread among different Rhizobium species (12). About 10% of the 64 type II strains analyzed produced melanine, whereas it is a very a common characteristic among R. leguminosarum bv. phaseoli

DISCUSSION

Phaseolus vulgaris L. is nodulated by an extensive range of Rhizobium strains (6,18,23,33,38,51), in many cases, effectively (38). In 1969 R.O.D. Dixon wrote "The isolation of rhizobia from P. vulgaris does not unambiguously provide strains of R. phaseoli" (15). This has turned out to be the reason why up to now worldwide collections of R. leguminosarum bv. phaseoli harbor heterogeneous groups of bacteria. Among strains isolated from bean nodules in agricultural fields where beans are a traditional crop, two genetically distinct types have been characterized (35,38). Type I strains correspond to R. leguminosarum bv. phaseoli characterized by a narrow host range nodulating Phaseolus vulgaris and a particular nif gene organization with multiple copies. Type II strains have single copies of nif genes and they also nodulate Leucaena spp. (35,38).

The genetic distances found either by numerical taxonomy, multilocus enzyme electrophoresis, DNA-DNA hybridization and the analysis of the nucleotide sequence of a 16S rRNA gene fragment indicate that type I and type II strains belong to distinct evolutionary lineages. Type IIA and type

IIB strains would belong to two lineages diverging from a common ancestor as shown by the similarity in the 16S rRNA nucleotide sequence. Both clusters show enough accumulated differences (as shown by all analyses) to account for two distinct species.

Thus we propose that IIA and IIB clusters represent two new species: Rhizobium martinesii sp. nov. and Rhizobium vincentii sp. nov. Their characteristics are described below: They are gram negative bacteria, aerobic, rods are 0.5-0.7 by 1.5- 2 μm , nonsporeforming. Colonies are circular, convex semitranslucent, usually 2-4 mm in diameter within 2-4 days in PY, Optimum pH is from 5 to 7. Large plasmids have been found in all strains tested, and on these strains the nod and nif genes lie on plasmids (5,37). They effectively nodulate Phaseolus vulgaris, and Leucaena spp. R. martinesii sp. nov. strains do not grow on LB medium, and always need calcium for growth. They form white opaque colonies on YM and are non-motile on 0.3% agar. They are susceptible to antibiotics as chloramphenicol, carbenicillin, spectinomycin, and rifampin and resistant to nalidixic acid. Maximum growth temperature is 35-37°C. They are a genetically homogeneous group with a characteristic ribosomal fingerprint, as shown by sequence and

RFLP's of 16S rRNA. Rhizobium vincentii strains grow on LB medium and on PY omitting calcium. They are resistant to various antibiotics such as chloramphenicol, spectinomycin, carbenicillin, rifampin; and in addition to various metals (M. Megias, personal communication). They grow on arginine, malate, hypoxanthine and sorbitol as carbon sources. They have a characteristic ribosomal fingerprint. Maximum growth temperature is 40°C.

The two well studied type II strains CFN299 and CIAT899 may be considered as the type strains of species R. martinesii and R. vincentii respectively, as they exhibit the described characteristics of each of the species. Cultures have been deposited in the American Type Culture Collection.

A comprehensive taxonomy of strains nodulating P. vulgaris will still require further research as there are other strains isolated from bean nodules that do not cluster with either type I, type IIA or type IIB strains. Such is the case of the ET's 33, 34 and 35 described and of the FL strains isolated from nodules from bean plants grown in fields of Leucaena spp trees (38,44). Also strains isolated from bean nodules grown in the U.S. eg. B599, Geneve (Schmidt, personal

communication) or in France (Amarger, personal communication) look quite different from type IIA and IIB strains. It seems that Rhizobium taxonomy would have to deal with a huge number of diverging clones or lineages sharing symbiotic capabilities (39), as anticipated by Young and Johnston, it seems that many genera and species of bacteria will be needed to accommodate all the root-nodule bacteria (67).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge D. Piñero and R. Palacios for helpful discussions, Ma. de los Angeles Moreno O. and M.A. Rogel H. for technical help and Jorge Hernández Cobos and Ana Maria Valdes for helping with computer programs. We are indebted to M. Saito, M. Sadowsky, W.Q. Ribeiro Jr. and B.D.W. Jarvis for providing strains. Partial financial support for this research was provided by grant No. 936-5542.01-523-8.600 from the U.S. Agency for International Development and by grant TS20199-C (GDF) from La Communauté Economique Européenne.

LITERATURE CITED

1. Bernaerts, M.J., and J. DeLey. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*, London, 197:406-407.
2. Beynon, J.L., and D.P. Josey. 1980. Demonstration of heterogeneity in a natural population of Rhizobium phaseoli using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.* 118:437-442.
3. Borthakur, D., J.A. Downie, A.W.B. Johnston, and J.W. Lamb. 1985. psi, a plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 200:278-282.
4. Borthakur, D., J.W. Lamb, and A.W.B. Johnston. 1987. Identification of two classes of Rhizobium phaseoli genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Mol. Gen. Genet.* 207:155-160.
5. Brom, S., E. Martinez, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of Rhizobium spp. strains that nodulate Phaseolus vulgaris. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1280-1283.
6. Bromfield, E.S.P., and L.R. Barran. 1990. Promiscuous nodulation of Phaseolus vulgaris, Macroptilium atropurpureum and Leucaena leucocephala by indigenous Rhizobium meliloti. *Can. J. Microbiol.* 36:369-372.

7. Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter, and H.F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 148:107-127.
8. Casanova, J.L., C. Pannetier, C. Jaulin, and P. Kourilsky. 1990. Optimal conditions for directly sequencing double-stranded PCR products with Sequenase. Nucl. Acids. Res. 18:4028.
9. Cunningham, S.D., and D.A. Munns. 1984. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in Rhizobium. Soil Sci. Soc. Amer. J. 48:1273-1276.
10. Chen, W.X., G.H. Yan, and J.L. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:392-397.
11. Crow, V.L., B.D.W. Jarvis, and R.M. Greenwood. 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of Rhizobium. Int. J. Syst. Bacteriol. 31:152-172.
12. Cubo, M.T., A.M. Buendia-Claveria, J.E. Beringer, and J.E. Ruiz-Sainz. 1988. Melanin production by Rhizobium strains. Appl. Environ. Microbiol. 54:1812-1817.
13. Darrow, R.A., and R.R. Knotts. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78:554-559.

14. Devereux, J., P. Haeberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12:387-395.
15. Dixon, R.O.D., 1969. Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). *Ann. Rev. Microbiol.* 23:137-158.
16. Dowdle, S.F., and B.B. Bohlool. 1985. Predominance of fast-growing Rhizobium japonicum in a soybean field in the people's republic of China. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1171-1176.
17. Dreyfus, B., J.L. Garcia, and M. Gillis. 1988. Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:89-98.
18. Eardly, B.D., D.B. Hannaway, and P.J. Bottomley. 1985. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants (Phaseolus vulgaris (L.) Savi). *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1422-1427.
19. Eardly, B.D., L.A. Materon, N.H. Smith, D.A. Johnson, M.D. Rumbaugh, and R.K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium Rhizobium meliloti. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:187-194.

20. Encarnación, S., V. Narváez, E. Martínez, Y. Mora, H. Taboada, A. Bravo, J. Calderón, and J. Mora. 1990. Glutamine cycling and unbalance growth in Rhizobium. In P. Gresshoff, E. Roth, G. Stacey & W.E. Newton (ed.), Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Chapman and Hall, New York, London. (In press).
21. Flores, M., V. González, S. Brom, E. Martínez, D. Piñero, D. Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol. 169:5782-5788.
22. Fuchs, R.L., and D.L. Keister. 1980. Identification of two glutamine synthetases in Agrobacterium. J. Bacteriol. 141:996-998.
23. Graham, P.H., and C.A. Parker. 1964. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. Plant Soil 20:383-396.
24. Graham, P.H., S.E. Viteri, F. Mackie, A.A.T. Vargas, and A. Palacios. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of Rhizobium phaseoli. Field Crops Res. 5:121-128.
25. Jarvis, B.D.W., A.G. Dick, and R.M. Greenwood. 1980. Deoxyribonucleic acid homology among strains of Rhizobium trifolii and related species. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:42-52.

26. Jarvis, B.D.W., M. Gillis, and J. de Ley. 1986. Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of Rhizobium and Bradyrhizobium species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:129-138.
27. Jarvis, B.D.W., C.E. Pankhurst, and J.J. Patel. 1982. Rhizobium loti, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:378-380.
28. Jordan, D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938, 321^{AL}, p. 234-254. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
29. Karanja, N.K., and M. Wood. 1988. Selecting Rhizobium phaseoli strains for use with beans (Phaseolus vulgaris L.) in Kenya: Infectiveness and tolerance of acidity and aluminium. *Plant Soil* 112:7-13.
30. Karanja, N.K., and M. Wood. 1988. Selecting Rhizobium phaseoli strains for use with beans (Phaseolus vulgaris L.) in Kenya: Tolerance of high soil temperature and antibiotic resistance. *Plant Soil* 112:15-22.
31. Keyser, H.H., B. Ben Bohlool, T.S. Hu, and D.F. Weber. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*. 215:1631-1632.
32. Kluge, A.G., and J.S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systemat. Zool.* 18:1-32.

33. Lange, R.T. 1961. Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of south-western Australia. J. Gen. Microbiol. 26:351-359.
34. Lindström, K. 1989. Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:365-367.
35. Martinez, E., M. Flores, S. Brom, D. Romero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Rhizobium phaseoli: A molecular genetics view. Plant Soil 108:179-184.
36. Martinez, E., and R. Palacios. 1984. Is it necessary to improve nitrogen fixation of bean in agricultural fields in México? p. 60. In C. Veeger & W.E. Newton (ed.), Advances in Nitrogen Fixation Research, Nijhoff, Junk & Pudoc, The Hague and Wageningen.
37. Martinez, E., R. Palacios, and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 169:2828-2834.
38. Martinez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen. Microbiol. 131:1779-1786.
39. Martinez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The Rhizobium genome. Critical Reviews Plant Sciences 9:59-93.

40. Martinez-Romero, E., and M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (Phaseolus vulgaris L.) nodulation competitiveness of genetically modified Rhizobium strains. Appl. Environ. Microbiol. 56:2384-2388.
41. Nei, M., J.C. Stephens, and N. Saiton. 1985. Methods for computing the standard errors of branching points in a evolutionary tree and their application to molecular data from humans and apes. Mol. Biol. Evol. 2:66-85.
42. Noel, K.D., F. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M.A. Cevallos. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn₅ insertions. J. Bacteriol. 158:148-155.
43. Oxford, G.S., and D. Rollinson (ed.). 1983. Protein polymorphism: adaptive and taxonomic significance. The Systematics Association Special Volume No. 24. Academic Press, Inc. (London). Ltd., London.
44. Piñero, D., E. Martinez, and R.K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2825-2832.
45. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature (London). 299:724-726.

46. Ramos, M.L.G., N.F.M. Magalhaes, and R.M. Boddey. 1987. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown Phaseolus vulgaris: effects of liming an acid soil on antibiotic resistance. *Soil. Biol. Biochem.* 19:179-185.
47. Rigby, P.W.J., M. Dieckman, C. Rhodes, and P. Berg. 1976. Labeling deoxyribonucleic acid to a high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
48. Robert, F.M., and E.L. Schmidt. 1985. Somatic serogroups among 55 strains of Rhizobium phaseoli. *Can. J. Microbiol.* 31:519-523.
49. Roberts, G.P., W.T. Leps, L.E. Silver, and W.J. Brill. 1980. Use of two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis to identify and classify Rhizobium strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:414-422.
50. Rosenberg, C., P. Boistard, J. Dénarié, and F. Casse-Delbart. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. *Mol. Gen. Genet.* 184:326-333.
51. Sadowsky, M.J., P.B. Cregan, and H.H. Keyser. 1988. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of Rhizobium fredii with Phaseolus vulgaris genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1907-1910.
52. Scholla, M.H., and G.H. Elkan. 1984. Rhizobium fredii sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:484-486.

53. Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios, and E. Martinez-Romero. 1990. Genetic structure of a soil population of non-symbiotic Rhizobium leguminosarum isolates. Appl. Environ. Microbiol. (submitted).
54. Selander, R.K., D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour, and T.S. Whittan. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51:873-884.
55. Selander, R.K., R.M. McKinney, T.S. Whittam, W.F. Bibb, D.J. Brenner, F.S. Nolte, and P.E. Pattison. 1985. Genetic structure of populations of Legionella pneumophila. 163:1021-1037.
56. Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
57. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
58. Trinick, M.J. 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of Lablab purpureus, Leucaena leucocephala, Mimosa sp., Acacia farnesiana, and Sesbania grandiflora and their affinities with other rhizobial groups. J. Appl. Bacteriol. 49:39-53.
59. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R.A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown-gall inducing ability. Nature (London) 252:169-170.

60. Vargas, A.A.T., and P.H. Graham. 1988. Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Res.* 19: 91-101.
61. Vargas, A.A.T., and P.H. Graham. 1989. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of Rhizobium in beans. *Plant Soil.* 117:195-200.
62. Vargas, C., L.J. Martinez, M. Megias and C. Quinto. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants in the broad host range Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strain CIAT 899. *Mol. Microbiol.* (In press).
63. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. p. 73-97. *International Biological Programme Handbook.* Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford.
64. Wedlock, D.N., and B.D.W. Jarvis. 1986. DNA homologies between Rhizobium fredii, rhizobia that nodulate Galega sp., and other Rhizobium and Bradyrhizobium species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:550-558.
65. Young, J.P.W. 1985. Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol.* 131:2399-2408.

66. Young, J.P.W. 1989. The population genetics of bacteria, p 417-438. In D.A. Hopwood and K.F. Chater (ed.), Genetics of bacterial diversity, Academic Press, London.
67. Young, J.P.W., and A.W.B. Johnston. 1989. The evolution of specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. Tree 4:341-349.
68. Zevenhuizen, L.P.T.M., and C. Bertocchi. 1989. Polysaccharides production by Rhizobium phaseoli and the typing of their excreted anionic polysaccharides. Fems Microbiol. Lett. 65:211-218.

FIG 1. Genetic relatedness among 35 ET's of type II strains, 2 ET's of type I strains and 3 ET's of outgroup reference strains, based on electrophoretically detectable allelic variation at enzyme loci. *Other strains corresponding to the same ET are shown in Table 1.

FIG 2. Autoradiogram of A) EcoRI, B) HindIII, C) XhoI ribosomal RFLP patterns of strains: a) CFN 42, type I; b) CFN 299, type IIA; and CIAT 899, type IIB. Molecular weight markers are expressed in Kb.

FIG 3. Sequence of a 16S RNA gene fragment of strains CFN 42, UMR 1173, CIAT 899 and CFN 299. Nucleotide differences are in lower case.

FIG 4. UPGMA with branching point standard error tree derived from 16S RNA gene fragment - sequences of Rickettsia rickettsii, R. typhi, R. prowazekii, Agrobacterium tumefaciens, Rochalimea quintana, Brucella abortus and Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli and type II strains.

FIG 5. Cladogram of mixed parsimony analysis of phenotypic characteristics of R. meliloti and NGR 234, ● R. leguminosarum, Δ R. loti, ▲ R. galega, ◇ type IIA, ◆ type IIB, ◆ type II unclassified strains (ET 33, 34 and 35).

Table 1. Bacterial Strains and ETs.

Strains	Original host plant	ET	Source or reference
<u>R. leguminosarum</u> bv.			
<u>phaseoli</u> (type I)			
CFN 42	<u>P. vulgaris</u> L.		45
Viking I	<u>P. vulgaris</u> L.		48
TAL 182	<u>P. vulgaris</u> L.		B. Ben Bohlool ^a
BR 10027	<u>P. vulgaris</u> L.		CNPBS
BR 10028	<u>P. vulgaris</u> L.	36	CNPBS
BR 10029	<u>P. vulgaris</u> L.		CNPBS
BR 10030	<u>P. vulgaris</u> L.	37	CNPBS
bv. <u>trifolii</u>			
USDA 2046	<u>Trifolium pratense</u> L.		USDA ^a
USDA 2152	<u>Trifolium subterraneum</u> L.		USDA ^a
bv. <u>viciae</u>			
USDA 2489	<u>Vicia faba</u> L.		USDA ^a
<u>R. meliloti</u>			
RCR 2011	<u>M. sativa</u>		50
R.me 1	<u>M. sativa</u>		CFN
<u>R. fredii</u>			
USDA 191	<u>G. max</u>		31
HH 103	<u>G. max</u>		16

Strains	Original host plant	ET	Source or reference
<u>R. galega</u>			
625 (=gal 3)	<u>Galega officinalis</u>		64
<u>R. loti</u>			
NZP 2037	<u>Lotus divaricatus</u>	39	11
<u>R. spp</u>			
CFN 234	<u>Leucaena leucocephala</u>	40	38
CFN 265	<u>Leucaena esculenta</u>		38
NGR 234		38	58
IIA			
CFN 299	<u>P. vulgaris</u> L.	1	37
BR 828	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 829	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 830	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 831	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 832	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 833	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 834	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 835	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 836	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 10031	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 10032	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 10033	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS

Strains	Original host plant	ET	Source or reference
BR 10034	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 10035	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 10036	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 10037	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 10038	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 837	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 838	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 839	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 840	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
BR 10039	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CNPBS
BR 841	<u>L. leucocephala</u>	1	CNPBS
C-05-I	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CENA ^a
Car 22	<u>P. vulgaris</u> L.	1	CENA ^a
UMR 1163	<u>P. vulgaris</u> L.	1	P. Graham
BR 10040	<u>P. vulgaris</u> L.	2	CNPBS
BR 10041	<u>P. vulgaris</u> L.	3	CNPBS
BR 10042	<u>P. vulgaris</u> L.	4	CNPBS
BR 842	<u>L. leucocephala</u>	5	CNPBS
BR 843	<u>L. leucocephala</u>	6	CNPBS
BR 844	<u>L. leucocephala</u>	7	CNPBS
BR 845	<u>L. leucocephala</u>	8	CNPBS
C-05-35	<u>P. vulgaris</u> L.	9	CENA ^a
BR 10043	<u>P. vulgaris</u> L.	10	CNPBS

Strains	Original host plant	ET	Source or reference
BR 10044	<u>P. vulgaris</u> L.	11	CNPBS
BR 10045	<u>P. vulgaris</u> L.	12	CNPBS
BR 846	<u>L. leucocephala</u>	13	CNPBS
UMR 1178 (IAPAR 47)	<u>P. vulgaris</u> L.	14	P. Graham
IIB			
BR 847	<u>L. leucocephala</u>	15	CNPBS
BR 848	<u>L. leucocephala</u>	15	CNPBS
BR 849	<u>L. leucocephala</u>	15	CNPBS
BR 850	<u>L. leucocephala</u>	16	CNPBS
BR 851	<u>L. leucocephala</u>	17	CNPBS
BR 852	<u>L. leucocephala</u>	18	CNPBS
BR 853	<u>L. leucocephala</u>	19	CNPBS
BR 854	<u>L. leucocephala</u>	20	CNPBS
UMR 1410 (CIAT 166)	<u>P. vulgaris</u> L.	21	P. Graham
CIAT 899	<u>P. vulgaris</u> L.	22	24
AD 822	(CIAT 899 derivative)	22	UBMyBV ^a
AD 4	(CIAT 899 derivative)	22	UBMyBV ^a
BR 855	<u>L. leucocephala</u>	23	CNPBS
BR 856	<u>L. leucocephala</u>	24	CNPBS
C-05 II	<u>P. vulgaris</u> L.	24	T. Saito ^a
BR 857	<u>L. leucocephala</u>	25	CNPBS

Strains	Original host plant	ET	Source or reference
BR 858	<u>L. leucocephala</u>	26	CNPBS
BR 859	<u>L. leucocephala</u>	27	CNPBS
BR 860	<u>L. leucocephala</u>	28	CNPBS
BR 861	<u>L. leucocephala</u>	29	CNPBS
BR 862	<u>L. leucocephala</u>	30	CNPBS
BR 10046	<u>P. vulgaris</u> L.	31	CNPBS
BR 863	<u>L. leucocephala</u>	32	CNPBS
UMR 1226			
(IAPAR 70)	<u>P. vulgaris</u> L.	33	P. Graham
BR 864	<u>L. leucocephala</u>	34	CNPBS
UMR 1173			
(IAPAR 69)	<u>P. vulgaris</u> L.	35	P. Graham

Agrobacterium

tumefaciens

C58

59

^aSources: B. Ben Bohlool, NifTAL Project, Paia, Hawaii; USDA Beltsville Rhizobium Culture Collection. Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705; M. Sadowsky, Department of Soil Sciences, University of Minnesota, MN 55108; M. Tsai, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; C. Quinto, Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal, UNAM, Ap.P. 565-A, Cuernavaca, México.

Table 2. Allele profiles at eight enzyme loci of 40 ET's

Allele at indicated enzyme locus:

ET	No. of isolates	HEX	IDH	XDH	MDH	ADH	IPO	G6P	PGM
1	30	5	5	5	5	5	5	5	5
2	1	5	5	5	5	5	5	5	5.1
3	1	5	5	5	5	5	5	5	4.9
4	1	5	5	5	5	5	5	5	5.5
5	1	5	5	5	5.5	5	5	5	5
6	1	5	5	4.8	5	5	5	5	5
7	1	5	5	5.5	5	5	5	5	5
8	1	5	4.5	5	5	5	5	5	5
9	1	5	6	5	5	5	5	5	5
10	1	4.9	5	5	5	5	5	5	5
11	1	5.5	5	5	5	5	5	5	6
12	1	5	4.8	5.1	5	5	5	5	5
13	1	5	5	5.1	5	6	5	5	5
14	1	5	5	5.5	5	4.7	5	5.2	5
15	3	5	4	6	6	4	7	4	5
16	1	5	4	6	6	5.9	7	4	5
17	1	5	4	6	6	4	6.5	4	5

ET	No. of								
	isolates	HEX	IDH	XDH	MDH	ADH	IPO	G6P	PGM
18	1	5	3.5	6	6	4	7	4	5
19	1	5	4	6.1	6	4	7	4	5
20	1	5.5	4	6.1	6	4	7	4	5
21	1	5	4.5	6.1	6	4	7	4	5
22	1	4.5	3	6.1	6	4	7	4	5
23	1	5.2	5	6.1	6	4	7	4	5
24	2	5.2	5	6	6	4	7	4	5
25	1	5.2	3.9	6.1	6	4	7	4	5
26	1	5.2	4	6	6	4	7	5	5
27	1	5.2	4	6	6	4	7	4	5
28	1	5	5	4.5	6	5.8	7	4	5
29	1	5	4	7	6	4.5	5	4	5
30	1	5	4	6.1	6	4.5	5	4	5
31	1	5	4	6	6	4.5	5	4	5
32	1	5	4	5	6	4.5	7	4	5
33	1	7	6	6.1	4.9	4	5	7	5
34	1	5	4.5	6	6	5.9	5	6	4
35	1	6	6	4.5	6	5.8	5	6	5.5
36	1	5	3	4	4	6	6	7	5.5
37	1	3	3	4	4	6	6	7	4
38	1	2	3	1	1	-	2	4.9	5
39	1	6	6	5	4	7	8	6	6
40	1	6	6	7	3	3	4	5.5	6

TABLE 3.

GENETIC DIVERSITY AT 8 ENZYME LOCI AMONG ETs.

Enzyme locus ^a	CHARACTERISTICS OF:							
	40 ETs ^b		35 ETs ^c		18 ETs ^d		14 ETs ^e	
	n. of alleles	h	n. of alleles	h	n. of alleles	h	n. of alleles	h
HEX	9	0.615	7	0.537	4	0.576	3	0.275
IDH	8	0.785	8	0.737	6	0.621	4	0.396
XDH	10	0.494	8	0.808	5	0.680	4	0.582
MDH	7	0.646	4	0.543	1	0	2	0.142
ADH	9	0.806	7	0.739	4	0.530	3	0.275
IPO	7	0.641	3	0.532	3	0.386	1	0
G6P	7	0.696	5	0.611	2	0.111	2	0.142
PGM	7	0.391	7	0.309	1	0	5	0.506
mean	8	0.619	6	0.602	3	0.363	3	0.289

a Loci designations are as in the text.

b Representing the total sample of 40 ETs examined.

c Representing the 35 ETs of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type II strains.

d Representing the 18 ETs of the type IIB strains.

e Representing the 14 ETs of the type IIA strains.

$h = (1 - \sum x_i^2) n / (n-1)$ where x_i^2 is the frequency of the i^{th} allele and n is the number of ETs

F_{ST} (TypeII vs. IIB) = 0.397

F_{ST} (TypeII vs. IIA) = 0.519

Table 5. Relevant phenotypic characters of Rhizobium strains^a.

Characteristics	<u>Rhizobium</u> Strains ^b	Type I Strains	Type IIA Strains	Type IIB Strains
Growth on LB medium	- ^c	-	-	+
Growth on PY				
omitting calcium	- ^d	-	- ^d	+ ^d
Growth on PY				
carbenicillin	-	-	-	+
Growth on PY				
spectinomycin	-	-	-	+
Growth on PY				
chloramphenicol	-	-	-	+
Growth on PY rifampin	-	-	-	+ ^d
Growth on MM arginine	-	-	-	+
Growth on MM malate	+ ^e	+ ^d	- ^d	+ ^d
Growth on MM hypoxanthine	- ^e	- ^e	-	+ ^d
Growth on MM sorbitol	- ^e	- ^e	-	+ ^d
Maximum growth				
temperature		35°C	37°C	40°C
Colony morphology				
in PY	variable	gummy	creamy	creamy
Colony morphology				
in YM	variable	wet-trans- lucent	white- opaque	wet- trans- lucent

Characteristics	<u>Rhizobium</u> Strains ^b	Type I Strains	Type IIA Strains	Type IIB Strains
Motility	+	+	-	+

^a Substrate and antibiotic concentration as described in Materials and Methods.

^b Rhizobium strains including R. galegae, R. loti, R. meliloti, R. leguminosarum bv. trifolii and viciae and R. sp. NGR 234.

^c Only R. meliloti strains grow on LB medium.

^d More than 90% of the strains presented this character.

^e More than 60% of the strains presented this character.

Table 4. Relative levels of homology at 65°C of DNA's from Rhizobium species with reference DNAs from IIA, IIB and R. meliloti strains.

DNA-hybridization (%) with the reference strains:

Strains:	CFN 299 (IIA)	CIAT 899 (IIB)	<u>R. meliloti</u> RCR 2011 ^{a)}
<u>R. leguminosarum</u>			
bv. <u>phaseoli</u>			
Viking I	21 (80)	15 (85)	-
CFN 42	26 (50)	19 (85)	-
bv. <u>trifolii</u>			
USDA 2046	20	30	-
USDA 2152	17	23	-
bv. <u>viciae</u>			
USDA 2489	16	27	-
<u>R. meliloti</u>			
RCR 2011	20	15	100
<u>R. fredii</u>			
USDA 191	15	24	20
HH 103	20	23	-

Strains:	CFN 299 (IIA)	CIAT 899 (IIB)	<u>R. meliloti</u> RCR 2011a)
----------	---------------	----------------	----------------------------------

R. galega

625	12	24	25
-----	----	----	----

R. loti

NZP 2037	10	15	19
----------	----	----	----

R. spp

CFN 234	21	38	-
---------	----	----	---

CFN 265	16	27	-
---------	----	----	---

NGR 234	-	15	-
---------	---	----	---

IIA

CFN 299	100	36	29
---------	-----	----	----

C-05-35	96 (25)	26 (82)	22
---------	---------	---------	----

UMR 1178	73 (48)	14 (82)	-
----------	---------	---------	---

BR 10035	98	-	-
----------	----	---	---

IIB

CIAT 899	39 (80)	100	14
----------	---------	-----	----

UMR 1410	-	88	-
----------	---	----	---

BR 859	-	72 (45)	-
--------	---	---------	---

BR 856	-	85	-
--------	---	----	---

BR 863	-	62 (45)	-
--------	---	---------	---

BR 864	18 (80)	22 (78)	-
--------	---------	---------	---

Strains:	CFN 299 (IIA)	CIAT 899 (IIB)	<u>R. meliloti</u> RCR 2011 ^{a)}
----------	---------------	----------------	--

UMR 1173	-	38 (78)	-
UMR 1226	-	28 (75)	-
<u>Agrobacterium</u>			
<u>tumefaciens</u>			
C58	10	17	-

a) R. meliloti strain RCR 2011 was included only as a reference to test the hybridization conditions used in this work.

ET

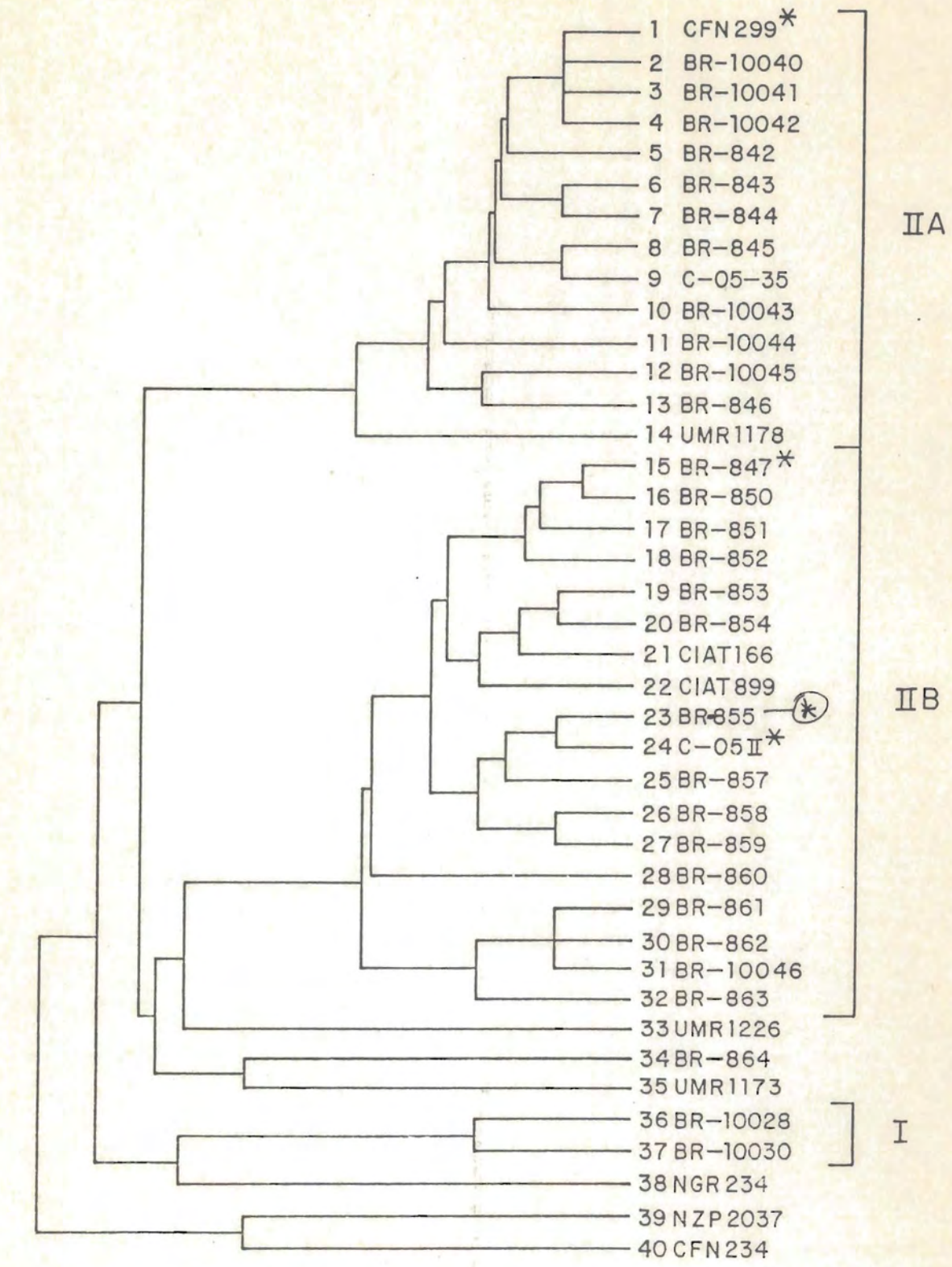




Fig. 2.

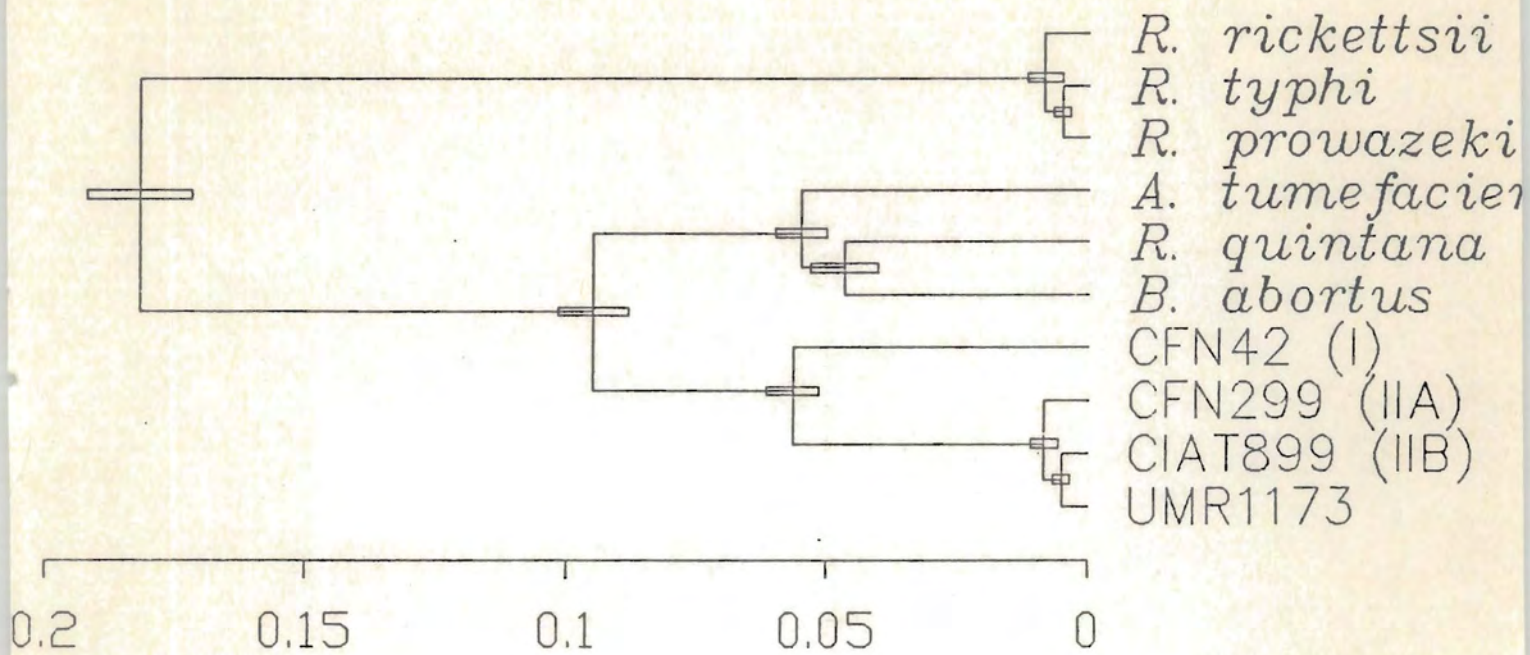
CFN42 CtGcAGAGATgcaGGGggttCTTCGGgacCGgcacACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
UMR1173 CtCtAGAGATatgGGGtcaCTTCGGtggCGaagaACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
CIAT899 CtCtAGAGATaggGGGtcaCTTCGGtggCGaagaACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
CFN299 CaCtAGAGATagtGGGtcaCTTCGGtggCGaagaACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC

GAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTtgGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC
GAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTtaGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC
GAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTcaGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC
GAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTtaGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC

CCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTC
CCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTC
CCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTC
CCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTC

TGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
TGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
TGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
TGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC

Fig. 3



ring

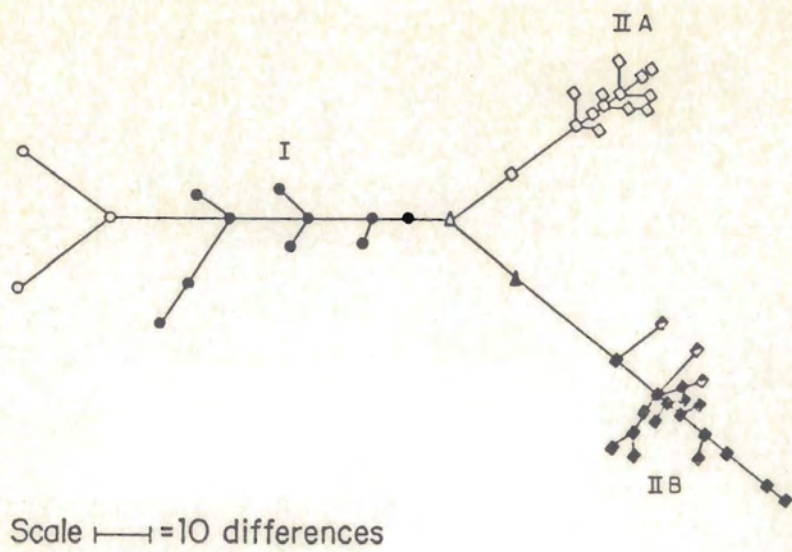


Fig 5

RESULTADOS ADICIONALES.

Genética de poblaciones molecular de *Rhizobium leguminosarum*.

Hasta la fecha las distancias observadas en una sola especie, por ejemplo *E. coli*, eran del orden de 0.5 (Selander *et al.*, 1986). Las distancias genéticas observadas por Piñero *et al.* en su estudio de la estructura genética de una colección de aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* son las más grandes que se han observado en una especie (Piñero, 1988). En este caso, dentro del grupo de las bacterias tipo I, se observan 7 ramas a 0.5 unidades de distancia genética (fig. 3). Estas distancias tan grandes sugieren que el grupo puede ser polifilético, es decir que diferentes líneas filogenéticas cromosomales formarían parte de la especie al adquirir el plásmido simbiótico del biovar *phaseoli*.

Como parte de los análisis realizados en el marco de los estudios anteriores, llevamos a cabo hibridaciones tipo Southern de DNAs totales cortados con HaeIII y Sau3A usando un probador que lleva un operón ribosomal de *E. coli*. Todas las cepas de *R. leguminosarum* de los biovares *viciae*, *trifolii*, *phaseoli* y los aislados no-simbióticos que se analizaron mostraron el mismo patrón de hibridación, salvo la cepa CFN3 del biovar *phaseoli* (fig. 4).

Secuenciamos parte del gen del rRNA 16S de seis de los aislados no-simbióticos y de la cepa CFN42 (un aislado simbiótico). Solo tres de las seis tenían una secuencia idéntica a la cepa CFN42. Las otras tres tenían dos secuencias distintas (fig.5). Los agrupamientos que se pueden realizar con estas tres secuencias correspon-

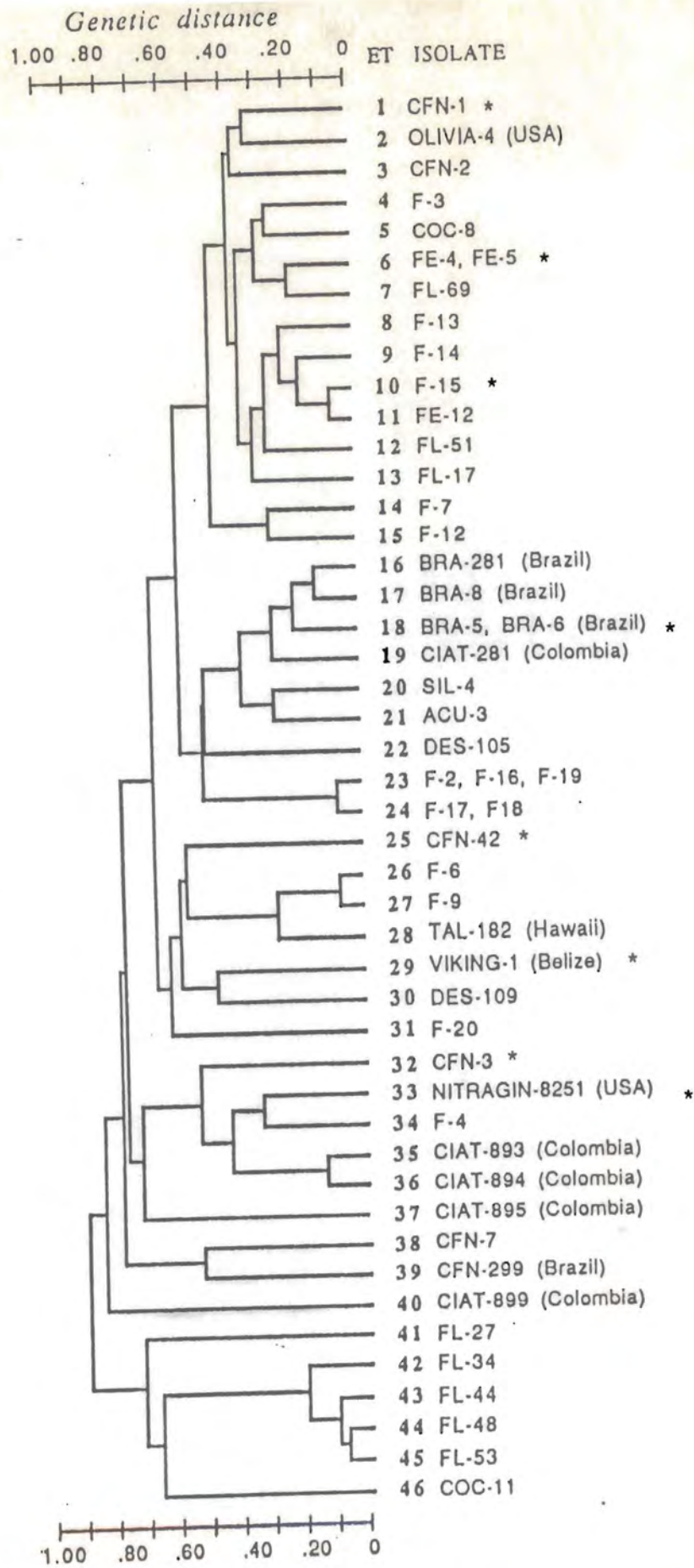


Fig. 3. Arbol de distancias genéticas de una colección de cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (tomado de Piñero et al. (1988)). Las cepas utilizadas para secuencia se encuentran indicadas por un asterisco.

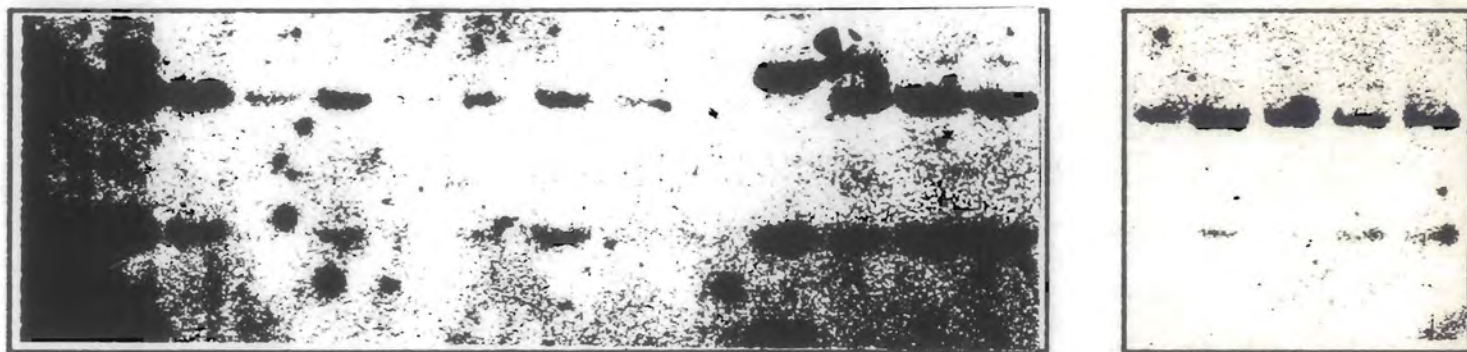


Fig. 4. Hibridaciones tipo Southern de DNA total de cepas de R. leguminosarum bvs. phaseoli, viciae, trifolii y no-simbióticas digeridos con Sau3A usando un detector que lleva el operón ribosomal rrnB de E. coli.

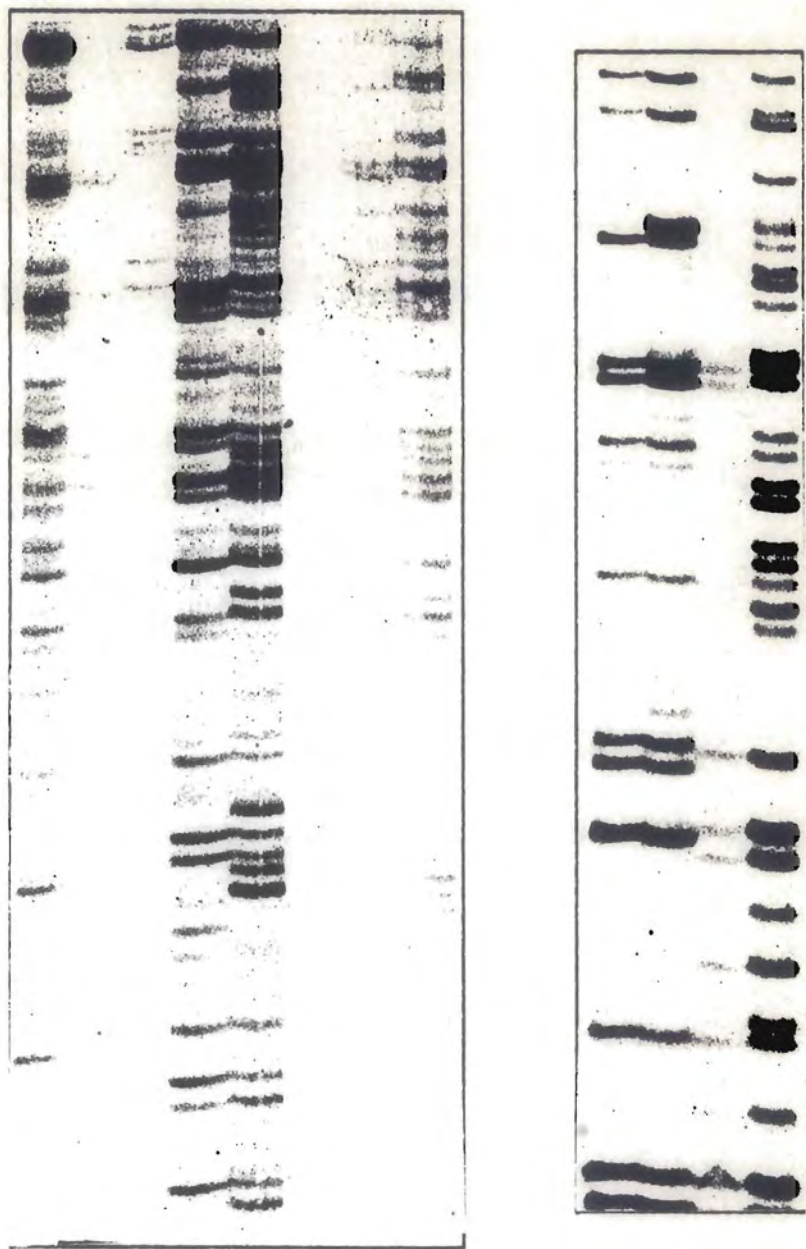


Fig. 5. Autorradiografías de secuencia mostrando algunas de las diferencias en las secuencias del rRNA 16s de distintas cepas de R. leguminosarum bv. phaseoli.

den a los agrupamientos observados con el análisis de electrofenotipos, lo cual indica que existen al menos tres líneas cromosomales principales en la población analizada.

Tenemos resultados preliminares de un análisis similar llevado a cabo en cepas representativas de los siete grupos de cepas tipo I de R. leguminosarum bv phaseoli separados por 0.5 unidades de distancia genética. En estas cepas hemos encontrado 5 secuencias diferentes del gen para el rRNA 16S. Cuando comparamos las secuencias de cepas cercanas (distancia menor a 0.5) observamos que son idénticas. De nuevo, estas secuencias se agrupan de la misma manera que con el análisis de electroferotipos.

DISCUSION.

Rhizobium leguminosarum no-simbióticos.

La inestabilidad de la información simbiótica de aislados de R. leguminosarum bv. phaseoli observada en el laboratorio indica que la pérdida del plásmido sim o de pedazos de este parece ser un fenómeno natural que ocurre a alta frecuencia (Brom, en prensa). Las cepas que carecen de esta información deben tener una dinámica distinta a las cepas simbióticas ya que no tendrían ciclos de enriquecimiento al liberarse de los nódulos senescentes. Sin embargo las bacterias del género Rhizobium son habitantes naturales y comunes del suelo. Una medida de adaptación es su permanencia en el suelo en ausencia de sus huéspedes naturales. Existen numerosos reportes que documentan la aparición de nódulos en raíces después de periodos de 30-50 años de no haber cultivado la planta huésped. En ese sentido la capacidad simbiótica no parece tener ningún papel en la vida saprófita de las bacterias y por lo tanto las bacterias carentes de esta información podrían sobrevivir en el suelo. En nuestro análisis encontramos una proporción de un aislado simbiótico por cuarenta no-simbióticos. Esta proporción bien podría ser mayor ya que no podemos desechar la posibilidad de que los aislados simbióticos hayan escapado de los nódulos en las raíces de las que aislamos nuestras cepas. Además esta proporción también puede variar en función del momento del muestreo y de las condiciones existentes en el suelo.

Al introducir un plásmido simbiótico en receptoras no-simbióticas observamos que éstas adquieren la capacidad de fijar

nitrógeno en simbiosis con raíces de frijol. Bajo nuestras condiciones no detectamos diferencias con la cepa control tanto en número de nódulos por planta como en actividad específica de nitrogenasa, sin embargo no sabemos si tienen las mismas capacidades de competencia en condiciones naturales.

Los aislados no-simbióticos pudieran tener un papel en la generación de nuevas cepas simbióticas con nuevas capacidades adaptativas por transferencia horizontal de información genética. La ocurrencia natural de este fenómeno ha sido demostrado por inconsistencias encontradas al agrupar cepas por genotipos plasmídicos, definidos por RFLPs, y genotipos cromosomales definidos por RFLPs o electrotipos (Kaijalainen y Lindstrom, 1989 y Young et al, 1988).

Ya que el género Rhizobium está definido por la capacidad de establecer una simbiosis con las raíces de una leguminosa, los aislados no-simbióticos, pese a ser cromosomalmente idénticos, están excluidos de la especie. La inclusión de estos aislados en la filogenia de Rhizobium provee un nuevo marco para la comprensión de la historia evolutiva de la interacción planta-bacteria. Para entender la ecología de Rhizobium es necesario tomar en cuenta a estos aislados no-simbióticos y su participación en la generación de nuevas cepas simbióticas con características adaptativas nuevas.

Rhizobium leguminosarum bv phaseoli tipo II.

Al ser capaces de establecer una simbiosis con raíces de frijol, las cepas tipo II habían sido clasificadas como R. leguminosarum

bv phaseoli pese a tener una serie de diferencias muy claras con las cepas tipo I. Estas diferencias incluyen tanto rasgos claramente cromosomales como rasgos plasmídicos.

La organización de los genes comunes de nodulación nodABC es distinta en los dos tipos de bacterias, en una cepa tipo II, CIAT899, forman un operón y en las tipo I, nodA está separado de nodBC formando dos unidades distintas de transcripción (Vazquez et al, en prensa). Además sólo existe una copia de los genes de la nitrogenasa en las cepas tipo II cuando existen tres en las cepas tipo I. Una característica fenotípica importante que distingue a los dos tipos de bacterias es la capacidad de la cepas tipo II de establecer una simbiosis con las raíces de Leucaena sp.. Estas características indican muy claramente que se trata de dos tipos distintos de plásmidos simbióticos.

El análisis de las características cromosomales de una colección de bacterias tipo II mostró que se pueden dividir en dos tipos cromosomales distintos e independientes de las cepas tipo I. Tanto el análisis por electroferotipos como por características bioquímicas dan el mismo resultado. El análisis de la secuencia de un fragmento del gen del rRNA 16S muestra que las bacterias del tipo I están filogenéticamente alejadas de las bacterias del tipo II, y éstas a su vez parecen haber divergido recientemente.

A raíz de estos estudios hemos propuesto dos nuevas especies de Rhizobium capaces de establecer una simbiosis con raíces de Phaseolus vulgaris y Leucaena sp.: Rhizobium vincentii, cepa tipo CIAT899, y Rhizobium martinesii, cepa tipo CFN299.

Estructura genética de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*.

El análisis de un fragmento de la secuencia del gen del rRNA 16S de una colección de cepas de *R. leguminosarum* de los tres biovares mostró que todas las secuencias eran idénticas (P. Young, comunicación personal). Las cepas de los biovares *phaseoli*, *viciae* y *trifolii* fueron aisladas en su mayoría de un terreno cercano a Norwich, Inglaterra; esta colección incluía además algunos aislados de *trifolii* australianos. El hecho que la secuencia fuera idéntica en los tres biovares apoya la idea de una especie única de *R. leguminosarum* con tres biovares. Los análisis de electroferotipos llevados a cabo con estas cepas inglesas mostraron que los índices de diversidad genética eran menores en que los observados en los aislados americanos y además los aislados de nódulos de raíces de frijol pertenecían a los electroferotipos más comunes encontrados en los aislados de nódulos en raíces de chícharo (el huésped de *R.l.* bv. *viciae*). Estos datos contrastan con los observados con aislados americanos de nódulos de raíces frijol, donde encontramos una mayor diversidad genética tanto en el análisis de electroferotipos como en el de secuencias del rRNA 16S. Considerando que el frijol tuvo un origen mesoamericano es posible que la diversidad genética que encontramos refleje la antigüedad de esta relación bacteria-frijol.

En Inglaterra hay especies nativas endémicas que son noduladas efectivamente por cepas de los biovares *trifolii* y *viciae* pero no hay ninguna especie nativa reportada que pueda ser nodulada por

cepas del biovar phaseoli. El frijol fué introducido en Europa durante el siglo XVI, por lo tanto los aislados de nódulos son cepas que aparecieron posterior o simultáneamente a este momento en los suelos europeos. Sin embargo los aislados ingleses de frijol tienen el mismo tipo de cromosoma que las cepas de los otros biovares y este a su vez parece ser muy diferente por electroferotipos de los tipos cromosomales mexicanos (P. Young, comunicación personal). Las cepas inglesas no serían descendientes cromosomales de cepas mexicanas sino que serían derivadas de cepas nativas que hayan adquirido por transferencia horizontal un plásmido simbiótico de un simbiote del frijol importado. En ausencia de simbioses de frijol adaptados a las condiciones de los suelos ingleses, estas cepas híbridas pueden tener capacidades competitivas superiores a las cepas importadas y por lo tanto prevalecer.

Para investigar estas posibilidades hemos iniciado un estudio de genética de poblaciones comparativa de cepas americanas de los tres biovares con cepas europeas, tanto a nivel de cromosoma como de plásmido simbiótico. Para esto estamos secuenciando fragmentos del gen del rRNA 16S para determinar cuántos y cuáles son los tipos cromosomales que se encuentran en aislados mexicanos de los tres biovares y cuáles son sus relaciones filogenéticas entre ellos y con la línea cromosomal determinada por Young et al. De la misma manera proponemos secuenciar fragmentos del gen nifH y de genes nod para investigar si los biovares, independientemente de su origen geográfico y del tipo de cromosoma que tengan, comparten o tienen líneas diferentes de plásmidos simbióticos.

CONCLUSION.

La clasificación actual de Rhizobium ha sido basada en características fenotípicas, sobre todo en la capacidad de establecer una simbiosis efectiva con las raíces de algunas leguminosas. Los estudios realizados hasta ahora han demostrado que el esquema taxonómico está equivocado. Para que este esquema tenga sentido biológico es necesario establecer una clasificación basada en fenotipos cromosomales más que en fenotipos plasmídicos. Por una parte se ha demostrado que existen bacterias carentes de información simbiótica cromosomalmente idénticas a bacterias simbióticas y por la otra existen especies, consideradas distintas en virtud de sus capacidades simbióticas, que tienen el mismo cromosoma.

Las historias evolutivas de los plásmidos parecen ser distintas a las de los cromosomas, ya que hay especies con plásmidos idénticos que tienen cromosomas distintos. La posibilidad de transferencia horizontal de plásmidos a fondos genéticos distintos permite la generación de nuevas variantes con capacidades adaptativas distintas. Para entender la evolución de la fijación de nitrógeno en simbiosis es necesario tomar en cuenta que es el producto de la interacción de dos elementos genéticos con historias evolutivas distintas.

REFERENCIAS.

- Brom, S., A. García de los Santos, Ma. de L. Girard, G. Dávila, R. Palacios, and D. Romero. *J. Bact.* (1991), 173, en prensa.
- Broughton, W.J., U. Samrey, and J. Stanley. 1987. *FEMS Microbiol. Lett.* (1987) 40: 251-2553.
- Chatton, E. *Titres et Travaux Scientifiques (1906-1937) d'Edouard Chatton.* (E. Sottano, Sète, France, 1938).
- Dykhuizen, D.E., L. Green. *Genetics.* 1986. 113. s17.
- Eardly, B. D., L. A. Materon, N. H. Smith, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. 56:187-194.
- Fox, G.E., E. Stackenbrandt, R.B. Hespell, J. Gibson, J. Mani-loff, T.A. Dyer, R.S. Wolfe, W.E. Balch, R. Tanner, L. Magrum, L.B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B.J. Lewis, D.A. Stahl, K.R. Luehrsen, K.N. Chen y C.R. Woese. *Science.* (1980) 209, 457-463.
- Fox, G.E., K.R. Luehrsen y C.R. Woese. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infectionskr.* (1982). 3, 330-345.
- Hedges, R.W., *Heredity,* (1972) 28, 39-48.
- Jensen, R.A., *Mol. Biol. Evol.* (1985) 2, 87-120.
- Johnson, J.L., *Bacterial Classification III: Nucleic acids in Bacterial Classification.* En " *Bergey's manual of Systematic Bacteriology,* N. Krieg Ed., (Williams and Wilkins, Baltimore, Ma, 1984) 1, 8-11.
- Kaijalainen S., and K. Lindström. *J. Bacteriol.* 1989. 171, 5561-5566.
- Mayr, E., *Growth of Biological Thought.* (Belknap Press, Cambridge, Mass, 1982).
- Milkman, R., and A. Stoltzfus. *Genetics.* 1988. 120, 359-366.
- Piñero, D., E. Martínez, and R.K. Selander. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. 54:2825-2832.
- Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. 1986. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:873-884.
- Soberón-Chávez, G., And R. Nájera. *Can. J. Microbiol.* 1989. 35, 464-468.
- Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sánchez and C.

Quinto. J. Bact. (1991) en prensa.

- Whittaker, R.H., Q. Rev. Biol. (1959) 34, 383-420.
- Whittaker, R.H. y L. Margulis, Biosystems (1978) 10, 3-18.
- Woese C., Microbiol. Rev., (1987) 51, 221-267.
- Woese C., O. Kandler y M.L. Wheelis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) 87, 4576-4579.
- Young, J.P.W. J. Gen. Microbiol. (1985). 131, 2399-2408.
- Young J.P.W., and M. Wexler. J. Gen. Microbiol. (1987). 134, 2731-2739.