



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE ECOLOGIA  
LAB. EVOLUCION MOLECULAR Y EXPERIMENTAL

GENETICA DE POBLACIONES Y EVOLUCION MOLECULAR DE  
Rhizobium etli Y Rhizobium gallicum.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A  
**CLAUDIA VERONICA SILVA ROMERO**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR

CIUDAD UNIVERSITARIA

JUNIO DE 2003



Instituto  
de  
Ecología



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	1
OBJETIVOS Y PRESENTACION .....	2
CAPITULO I.- INTRODUCCION GENERAL .....	3
I.1 La interacción rizobios-leguminosas .....	3
I.1.1 Ecología de los rizobios.....	3
I.1.2. Ubicación taxonómica de los rizobios.....	4
I.1.3 Evolución de la simbiosis.....	5
I.2 Genética de poblaciones y evolución en bacterias .....	6
I.2.1 El papel del intercambio genético en la evolución bacteriana .....	6
I.2.2 Aislamiento sexual en bacterias .....	9
I.3 El concepto de especie en bacterias.....	12
I.3.1 Generalidades sobre los conceptos de especie .....	12
I.3.2 Los conceptos de especie en bacterias .....	15
I.3.4 Una propuesta sobre el concepto de especie .....	19
I.4 Marcadores genéticos y evolución molecular.....	21
I.4.1 Evolución molecular.....	21
I.4.2 Marcadores empleados en este estudio .....	22
I.4.2.1 <i>rrs</i> : .....	22
I.4.2.2 <i>glnII</i> :.....	24
I.4.2.3 <i>atpD</i> :.....	25
I.4.2.4 <i>nifH</i> :.....	25
I.4.2.5 <i>nodB</i> : .....	25
CAPITULO II.- <i>Rhizobium etli</i> and <i>Rhizobium gallicum</i> nodulate common bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics and biogeographic implications .....	27
II.1 Resumen .....	27
CAPITULO III.- ANALISIS POBLACIONAL A NIVEL MOLECULAR.....	28
III.1 Metodología.....	28
III.1.1 Secuenciación y alineamiento.....	28
III.1.2 Parámetros poblacionales y patrones de sustitución.....	28
III.1.3 Prueba de neutralidad de Tajima y detección de selección .....	28
III.1.4 Splits decomposition.....	29
III.1.5 Prueba de incongruencia (ILD).....	29

III.2 Resultados .....	30
III.2.1 Diversidad genética del gen <i>rrs</i> .....	30
III.2.2 Diversidad genética del gen <i>glnII</i> .....	31
III.2.3 Diversidad genética del gen <i>atpD</i> .....	32
III.2.4 Diversidad genética del gen <i>nifH</i> .....	32
III.2.5 Diversidad genética del gen <i>nodB</i> .....	33
III.2.6 Análisis de congruencia filogenética entre genes cromosomales .....	34
III.2.7 Análisis de congruencia filogenética entre genes plasmídicos .....	35
III.2.8 Análisis de congruencia entre genes cromosomales y genes plasmídicos .....	35
III.2.9 Análisis comparativo entre marcadores moleculares .....	36
III.3 Discusión .....	37
CAPITULO IV.- ANALISIS FILOGENETICO A NIVEL MOLECULAR .....	51
IV.1 Metodología .....	51
III.1.1 Reconstrucciones filogenéticas .....	51
IV.2 Resultados .....	52
IV.2.1 Relaciones filogenéticas del gen <i>rrs</i> .....	52
IV.2.2 Relaciones filogenéticas del gen <i>glnII</i> y la proteína GSII .....	54
IV.2.3 Relaciones filogenéticas del gen <i>atpD</i> y la proteína AtpD .....	54
IV.2.4 Relaciones filogenéticas del gen <i>nifH</i> y la proteína NifH .....	55
IV.2.5 Relaciones filogenéticas del gen <i>nodB</i> y la proteína NodB .....	56
IV.3 Discusión .....	57
CAPITULO V.- DISCUSION GENERAL .....	69
V.1 La diversidad genética en los nódulos de frijol de San Miguel .....	69
V.2 Las clonas epidémicas de los nódulos .....	70
V.3 El nicho simbiótico de <i>R. etli</i> y <i>R. gallicum</i> en San Miguel .....	71
V.4 Los plásmidos de <i>R. etli</i> y <i>R. gallicum</i> .....	72
V.5 Historia evolutiva de <i>R. etli</i> y <i>R. gallicum</i> en San Miguel .....	75
V.6 La distribución geográfica de <i>R. gallicum</i> ( <i>sensu lato</i> ) y <i>R. etli</i> .....	75
V.7 ¿Qué especies de rizobios hay en San Miguel? .....	76
V.8 ¿Existe aislamiento sexual entre las poblaciones de <i>R. etli</i> y <i>R. gallicum</i> de San Miguel? .....	78
V.9 Recomendaciones agroecológicas .....	79
REFERENCIAS .....	83
AGRADECIMIENTOS .....	102

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Haplotipos de los genes <i>rrs</i> , <i>glnII</i> , <i>atpD</i> , <i>nifH</i> y <i>nodB</i> de 35 aislados obtenidos de nódulos de <i>P. vulgaris</i> y cepas de referencia .....	41
Tabla 2.- Tabla de parámetros poblacionales para las secuencias de los genes <i>rrs</i> , <i>glnII</i> , <i>atpD</i> , <i>nifH</i> , y <i>nodB</i> .....	42
Tabla 3.- Prueba de congruencia entre pares de genes (ILD).....	43
Tabla 4.- Parámetros nucleotídicos estimados en base al modelo seleccionado por la prueba jerárquica de razones de verosimilitud (HLRT).....	61
Tabla 5.- Descripción de los aislados del grupo de <i>R. gallicum (sensu lato)</i> incluidos en la filogenia <i>rrs</i> presentada en la Figura 9.....	62

## INDICE DE FIGURAS

Esquema 1.- Representación de la organización jerárquica de los principales conceptos de especie.....	21
Figura 1.- Filogramas de los genes cromosomales <i>rrs</i> , <i>glnII</i> y <i>atpD</i> .....	44
Figura 2.- Análisis de <i>splits decomposition</i> para los genes cromosomales <i>rrs</i> , <i>glnII</i> y <i>atpD</i> .....	45
Figura 3.- Filogramas de los genes plasmídicos <i>nifH</i> y <i>nodB</i> .....	46
Figura 4.- Análisis de <i>splits decomposition</i> para los genes cromosomales <i>nifH</i> y <i>nodB</i> .....	47
Figura 5.- Relaciones entre ETs y haplotipos <i>rrs</i> , <i>glnII</i> y <i>atpD</i> .....	48
Figura 6.- Relaciones entre perfiles de plásmidos, haplotipos <i>nifH</i> y <i>nodB</i> , patrones RFLP de <i>nifH</i> y tamaño del <i>pSym</i> .....	49
Figura 7.- Relaciones entre patrones RFLP de <i>nifH</i> , haplotipos <i>nifH</i> y <i>nodB</i> , y tamaño del <i>pSym</i> .....	50
Figura 8.- Relaciones entre ETs, haplotipos <i>nifH</i> y <i>nodB</i> , patrones RFLP de <i>nifH</i> y tamaño del <i>pSym</i> .....	51
Figura 9.- Filogenia del gen <i>rrs</i> .....	63
Figura 10.- Filogenia del gen <i>glnII</i> . .....	64
Figura 11.- Filogenia del gen <i>atpD</i> .....	65
Figura 12.- Filogenia del gen <i>nifH</i> . .....	66
Figura 13.- Filogenia del gen <i>nodB</i> .....	67
Figura 14.- Filogenia de las proteínas GSII y AtpD.....	68
Figura 15.- Filogenia de las proteínas NifH y NodB.....	69
Figura 16.- Perfiles de plásmidos de cepas representativas de <i>R. gallicum</i> y <i>R. tropici</i> .....	75
Figura 17.- Perfiles de plásmidos de <i>R. etli</i> más abundantes en San Miguel.....	75

## RESUMEN

En este trabajo se estudiaron la estructura genética y los patrones de evolución molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno. Durante tres años consecutivos se aislaron bacterias endosimbióticas de nódulos de raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en una parcela de milpa en San Miguel Acuexcomac, Puebla, México. Para analizar la variación genética de los aislados se utilizaron diversos marcadores moleculares: electroforesis de isoenzimas, perfiles de plásmidos, hibridaciones con una sonda del gen *nifH*, análisis con enzimas de restricción de productos de amplificación del gen *rrs*, y secuencias nucleotídicas de los genes *rrs*, *glnII*, *atpD*, *nifH* y *nodB*. Los marcadores genéticos mostraron que los aislados pertenecen a las especies *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* y *R. gallicum* bv. *gallicum*. Los análisis a nivel poblacional sugirieron que existe intercambio genético entre los miembros de cada población pero no entre especies, tanto a nivel del cromosoma como de los plásmidos. Los genes codificados en el cromosoma (*rrs*, *glnII* y *atpD*) mostraron tener historias evolutivas diferentes a las de los genes codificados en el plásmido simbiótico (*nifH* y *nodB*), lo que sugiere la transferencia lateral de plásmidos entre distintos fondos cromosomales. El análisis filogenético de las secuencias mostró poca diferenciación genética entre aislados de *R. etli* y *R. gallicum* de diferentes localidades, y que las especies *R. mongolense* y *R. yanglingense* pueden ser parte del linaje de *R. gallicum*. En base a estos resultados, se discute el concepto de especie empleado en bacteriología y se plantean hipótesis sobre las historias evolutivas de las especies analizadas.

## ABSTRACT

In this work, the genetic structure and patterns of molecular evolution of nitrogen fixing bacteria were studied. During three consecutive years endosymbiotic bacteria were isolated from the root nodules of beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivated in a milpa plot in San Miguel Acuexcomac, Puebla, Mexico. To analyze the genetic variation of the isolates diverse molecular markers were used: isozyme electrophoresis, plasmid profiles, Southern-hybridization with a *nifH* probe, restriction enzyme analyses of amplified *rrs* gene, and the nucleotide sequences of *rrs*, *glnII*, *atpD*, *nifH* and *nodB* genes. The genetic markers showed that the isolates belonged to the species *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* and *R. gallicum* bv. *gallicum*. Population level analyses showed the existence of genetic exchange among the members of each population but not across species, both at the chromosome and the plasmid levels. The chromosome encoded genes (*rrs*, *glnII* y *atpD*) showed evolutionary histories different from those of the plasmid encoded genes (*nifH* y *nodB*), suggesting the lateral transfer of plasmids across distinct chromosomal backgrounds. The phylogenetic analysis of the DNA sequences showed little genetic differentiation among *R. etli* and *R. gallicum* isolates from different localities, and that the species *R. mongolense* and *R. yanglingense* could be part of the *R. gallicum* lineage. Based on these results, the species concept used in bacteriology is discussed, and hypotheses about the evolutionary histories of these species are formulated.

## **OBJETIVOS Y PRESENTACION**

El presente trabajo tiene como objetivo general conocer la estructura genética y los patrones de evolución molecular de las bacterias asociadas al frijol común cultivado en una parcela de milpa en San Miguel Acuexcomac, Puebla. Una parcela se muestreó durante tres años consecutivos para determinar la estabilidad temporal de la estructura genética. Utilizamos varios tipos de marcadores moleculares para conocer la variación genética tanto del compartimiento cromosomal como del plasmídico, y para analizar los patrones de evolución molecular con diferentes niveles de resolución. Un objetivo particular importante de este trabajo fue establecer la identidad taxonómica de los aislados. Por último, discutimos la importancia de la conceptualización y delimitación de las especies bacterianas, y los patrones filobiogeográficos de las especies encontradas.

Esta tesis está dividida en 5 capítulos que abarcan los aspectos metodológicos y conceptuales del trabajo realizado. El capítulo I consiste de una introducción general en la que se abordan las generalidades de la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas, aspectos importantes en la evolución de bacterias, generalidades sobre el concepto de especie y los marcadores moleculares. El capítulo II consta del artículo publicado, en el que se presentan los resultados sobre la estructura genética temporal y el análisis del compartimiento plasmídico, basados principalmente en isoenzimas y perfiles de plásmidos, así como el análisis más detallado de una submuestra de aislados utilizando otros marcadores moleculares. En los capítulos III y IV se presentan los resultados aún no publicados del análisis de las secuencias nucleotídicas de 5 genes. En el capítulo III se reportan los resultados del análisis a nivel poblacional, utilizando métodos de genética de poblaciones a nivel molecular. En el capítulo IV se reportan los resultados del análisis filogenético, donde se examinan las secuencias en un marco de referencia más amplio incluyendo otros rizobios. Cada uno de los capítulos III y IV consta de una sección de métodos, una de resultados y una de discusión. En esta última se discuten los resultados a la luz de los conceptos de especie. Por último, en el capítulo V se hace una discusión general de los resultados presentados en los capítulos II, III y IV. Este último capítulo está dividido en secciones que se pueden leer independientemente, en las que se trata de enlazar los resultados de los capítulos anteriores, discutir nuestros resultados a la luz de otros trabajos y de enfatizar aspectos teóricos y metodológicos que no se discutieron en los capítulos anteriores.

## CAPITULO I.- INTRODUCCION GENERAL

### I.1 La interacción rizobios-leguminosas

#### I.1.1 Ecología de los rizobios

Las bacterias que ocupan los nódulos de plantas leguminosas son un grupo polifilético colectivamente llamado rizobios (Sadowsky y Graham, 1998). La característica fenotípica por las que se les denomina sí es su habilidad de disparar el desarrollo de órganos fijadores de nitrógeno, llamados nódulos, en las raíces o tallos de plantas hospederas específicas que, con una excepción, son leguminosas (Long, 1989; Sadowsky y Graham, 2002; van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Las simbiosis establecidas entre rizobios y leguminosas es la interacción planta-bacteria más estudiada (Sadowsky y Graham, 2002; Spaink *et al.*, 1998). La mayor parte del conocimiento sobre la simbiosis se relaciona con la estructura, regulación y función de los genes involucrados en la nodulación y fijación de nitrógeno, el intercambio de señales entre los simbiosites y la respuesta de las plantas a los factores de nodulación producidos por las bacterias (Long, 1989; Long, 2001; Sadowsky y Graham, 2002; van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Sin embargo, el conocimiento que tenemos sobre la ecología de los rizobios es limitado y fragmentario (Sadowsky y Graham, 1998). Los rizobios tienen una valencia ecológica muy amplia. Se les encuentra en el suelo como saprófagos, viven en la rizósfera de leguminosas y otras plantas como rizobacterias, y pueden colonizar el nicho ecológico único de los nódulos en los que, tras ser endocitados por las células del hospedero, se diferencian en bacteroides. Los rizobios en sus historias de vida alternan entre estadios de vida libre en el suelo y la rizósfera, con estadios endosimbióticos, en los que las células se encuentran alojadas en un compartimiento intracelular del tejido central del nódulo, denominado simbiosoma (Brewin, 1998; Sadowsky y Graham, 1998).

La asociación con los rizobios permite a las leguminosas colonizar hábitats deficientes en nitrógeno, donde otras plantas son incapaces de crecer. La asociación con las leguminosas beneficia directamente a las poblaciones de rizobios dentro de los nódulos, al proporcionarles protección y fuentes de carbono, e indirectamente a las poblaciones de la rizósfera al suministrarles compuestos necesarios para su crecimiento a través de los exudados de las raíces (Brockwell *et al.*, 1995; Long, 1989; Sadowsky y Graham, 2002). Esta asociación no es obligatoria. Las poblaciones de leguminosas pueden existir sin asociarse con los rizobios. En suelos con alto contenido de nitrógeno asimilable, las plantas lo toman directamente del suelo sin tener que invertir energía en la formación de nódulos y en el mantenimiento de los bacteroides fijadores de nitrógeno (Brockwell, *et al.*, 1995; Sprent *et al.*,



1987). Asimismo, los rizobios suelen existir en el suelo sin asociarse con las leguminosas. Bajo estas condiciones tiene un metabolismo saprófago que utiliza los nutrientes del suelo como fuente de carbono y energía (Sadowsky y Graham, 1998). La simbiosis que llegan a establecer los rizobios y las leguminosas se ha considerado una simbiosis mutualista (Long, 1989; Spaink, et al., 1998), sin embargo, al no ser obligatoria, esta interacción constituye más una relación de protooperación que de mutualismo en sentido estricto (Cheng, 1991).

La persistencia evolutiva de la simbiosis durante millones de años sugiere que los rizobios que infectan a las leguminosas tienen más prole que los que sólo colonizan la rizósfera. Se ha demostrado la prevalencia de los genotipos de rizobios infectivos en los suelos después del cultivo del hospedero (Denison, 2000; Reyes y Schmidt, 1979). Sin embargo, entre los rizobios simbióticos existen los rizobios “mutualistas” que cooperan con la planta al brindarle nitrógeno fijado ( $\text{Fix}^+$ ) y los rizobios “parásitos” que utilizan el abasto de carbono de la planta, pero no fijan nitrógeno ( $\text{Fix}^-$ ). La existencia de ambos tipos de rizobios en las raíces de una planta sugiere que existen sanciones por parte de la leguminosa contra los rizobios que no fijan nitrógeno una vez establecidos en las células del nódulo (Denison, 2000). Ello podría explicar la prevalencia de infecciones  $\text{Fix}^+$  en nódulos de leguminosas silvestres en distintos ecosistemas (Sprent, 1995; Sprent, 2001). Posiblemente gracias a esta ventaja selectiva, el principal aporte neto de nitrógeno al ciclo biogeoquímico de este elemento se deba a la fijación simbiótica de nitrógeno (Paul y Clark, 1989).

### **1.1.2. Ubicación taxonómica de los rizobios**

En la actualidad la clasificación taxonómica de las bacterias está basada principalmente en las secuencias del gen *rrs* que codifica para el rRNA 16S (Ludwig y Schleifer, 1994; Weisburg *et al.*, 1991; Woese *et al.*, 1990). Esta clasificación ubica a la mayoría de los rizobios en la subclase  $\alpha$  de las Proteobacterias (Martínez, 1994; Willems y Collins, 1993; Young, 1993; Young y Haukka, 1996). En la clasificación actual reconocida en el Manual de Bergey (Madigan *et al.*, 2000), los rizobios se encuentran en cuatro familias del orden Rhizobiales: Rhizobiaceae, que incluye a los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*; Phyllobacteriaceae, que contiene a *Mesorhizobium*; Hyphomicrobiaceae, que incluye a *Azorhizobium*; y Bradyrhizobiaceae, que contiene al género *Bradyrhizobium*. Los géneros de rizobios están filogenéticamente relacionados con otras bacterias de vida libre o patogénicas (Sadowsky y Graham, 2002; van Berkum y Eardly, 1998; Willems y Collins, 1993). En la taxonomía de los rizobios se han propuesto algunas modificaciones, como la incorporación de las especies del género *Agrobacterium* a *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001) y la inclusión de la única

especie del género *Ensifer* en *Sinorhizobium* (Willems *et al.*, 2003). Hay un reporte de una metilobacteria ( $\alpha$ -Proteobacteria) noduladora y fijadora, por lo que se propone la especie *Methylobacterium nodulans* (Sy *et al.*, 2001). Bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*, pertenecientes a la subclase  $\beta$  de las Proteobacterias, son capaces de ocupar nódulos de leguminosas y fijar nitrógeno (Chen *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2001). Estos descubrimientos generan interrogantes sobre el origen evolutivo de las simbiosis. El estudio de la ecología evolutiva de éste amplio espectro de bacterias llamadas rizobios, puede y ha aportado información valiosa sobre cómo evolucionan las poblaciones naturales de bacterias.

### I.1.3 Evolución de la simbiosis

La distribución de los rizobios en las subclases  $\alpha$  y  $\beta$  de las Proteobacterias, con raíces filogenéticas profundas y mezclados con bacterias no simbióticas (Martínez, 1994; Young, 1993), genera preguntas sobre la evolución de la simbiosis. ¿Evolucionó independientemente en varios linajes de Proteobacterias, o surgió en su ancestro común y se perdió en sus parientes no simbióticos, o se desarrolló en un linaje y fue transferido a otros?

El tiempo de divergencia entre linajes de rizobios calculado, por ejemplo, para *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, muestra que su ancestro común vivió antes del origen de las plantas terrestres (Turner y Young, 2000), por lo que la hipótesis de un ancestro simbiótico queda prácticamente descartada. Las reconstrucciones filogenéticas de los genes *nod* indican un ancestro común entre ellos (Laguerre *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 1995; Wernegreen y Riley, 1999), por lo que la hipótesis de evolución independiente es poco probable. La hipótesis más fuertemente apoyada por las evidencias es la de un sólo origen evolutivo y la transferencia lateral de la información simbiótica entre linajes (Young y Johnston, 1989).

Los genes de fijación (*nif*) y nodulación (*nod*) de los rizobios se encuentran ligados, ya sea en islas simbióticas cromosomales, como en *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, o en plásmidos simbióticos, como en *Sinorhizobium* y *Rhizobium* (Freiberg *et al.*, 1996; Galibert *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002). Probablemente el ancestro común de los rizobios no era simbiótico, pero es posible que tuviera la capacidad de fijar nitrógeno (Young, 1993; Young y Johnston, 1989). Hay evidencia que sugiere que los rizobios heredaron directamente de sus ancestros los genes de fijación de nitrógeno, de hecho se ha encontrado congruencia entre las filogenias de *nifH* y *rrs* (Hennecke *et al.*, 1985). Al parecer los genes de nodulación se adquirieron después, probablemente durante la evolución y diversificación de las leguminosas. Estudios recientes

muestran que los genes *nod* comunes comparten historias evolutivas entre ellos pero diferentes a la del gen *nifH* (Laguerre, et al., 2001), lo cual apoya que estos genes no se adquirieron juntos. Sin embargo, los genes de fijación y nodulación están ligados, por lo que su historia reciente puede ser similar (Young y Johnston, 1989). Independientemente de su origen evolutivo, una vez que los genes *nif* y *nod* están agrupados, la transferencia lateral de las funciones simbióticas entre fondos cromosomales diversos, seguida de la adaptación a nuevos nichos ecológicos ha impulsado la evolución de los rizobios (Broughton y Perret, 1999).

La pérdida y adquisición de información simbiótica ocurre frecuentemente en la naturaleza (Segovia *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1995). Los caminos evolutivos de la simbiosis pueden vislumbrarse a través de pruebas de congruencia filogenética entre los *loci* simbióticos y los cromosomales (Wernegreen y Riley, 1999). El desacoplamiento evolutivo de estos dos compartimentos del genoma tiene como consecuencia que las poblaciones de rizobios pueden adaptarse a distintos hábitats del suelo y divergir en sus *loci* cromosomales de mantenimiento, aunque compartan un acervo de genes simbióticos y nodulen al mismo hospedero a lo largo de diferentes hábitats (Wernegreen y Riley, 1999). El descubrimiento de mecanismos naturales para transferir información simbiótica entre bacterias del suelo (Laguerre *et al.*, 1992; Louvrier *et al.*, 1996; Schofield *et al.*, 1987; Sullivan, et al., 1995; Wernegreen y Riley, 1999; Wernegreen *et al.*, 1997; Young y Wexler, 1988) y el descubrimiento de que la mayoría de los rizobios del suelo no son simbióticos (Segovia, et al., 1991), marcan un parte-aguas en nuestro entendimiento de la ecología evolutiva de los rizobios.

## **I.2 Genética de poblaciones y evolución en bacterias**

### **I.2.1 El papel del intercambio genético en la evolución bacteriana**

Podemos distinguir dos procesos fundamentales en la transferencia lateral de información entre bacterias. Uno mediado por recombinación homóloga, en la que se sustituyen fragmentos de DNA existentes, y el otro mediado por recombinación sitio específica, o aún ilegítima, en la que se introducen al genoma nuevos fragmentos de DNA (Gogarten *et al.*, 2002; Snyder y Champness, 1997). La frecuencia y el impacto de estos procesos tienen consecuencias importantes sobre la estructura genética y los mecanismos de evolución de las bacterias.

Las bacterias se reproducen por fisión binaria, las células madre dan lugar a dos células hijas, cada una conteniendo información genética idéntica a la de su progenitora. En estas poblaciones clonales la variación ocurre por mutaciones transferidas a los descendientes de las células en que

surgieron, emergiendo nuevos linajes por la acumulación durante generaciones de mutaciones sucesivas. Este tipo de transferencia de información genética se conoce como vertical, mientras que la transferencia horizontal se refiere al movimiento de información genética entre células que no necesariamente comparten un ancestro reciente (Gogarten, et al., 2002; Spratt y Maiden, 1999). Se conocen tres mecanismos generales por los que las bacterias pueden transferir lateralmente información genética: conjugación, transformación y transducción. Estos mecanismos sexuales, o más bien parasexuales, difieren en muchos aspectos de los mecanismos sexuales de los eucariontes: 1) son unidireccionales, de un donador a un receptor, 2) se transfiere sólo una fracción del genoma, que puede involucrar desde algunos pares de bases a cientos de kilobases, dependiendo principalmente del mecanismo de transferencia, y 3) están desacoplados de la reproducción, por lo que estos eventos no necesariamente ocurren en cada generación, una frecuencia de recombinación de  $10^{-3}$  por generación se consideraría muy alta (Cohan, 1994; Gogarten, et al., 2002; Maynard Smith, 1995). La contribución relativa de la recombinación con respecto a la mutación en generar nuevos genotipos varía entre especies y poblaciones bacterianas, conforme ésta aumenta, la clonalidad de la población disminuye. Existe un amplio espectro de estructuras poblacionales, con pocas especies ocupado los extremos de alta clonalidad (como *Salmonella enterica*) y completamente no-clonal (como *Neisseria gonorrhoeae* o *Helicobacter pylori*), mientras que la mayoría (como *Escherichia coli* y *Rhizobium etli*) contiene elementos clonales y no-clonales (Gordon *et al.*, 1995; Maggi Solcà *et al.*, 2001; Maynard Smith *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 1992; Spratt y Maiden, 1999). Si las poblaciones fueran clonales, los diferentes linajes que surgieron por mutación serían independientes, estarían sujetos a los efectos de selección periódica y las filogenias derivadas de sus genes podrían equipararse con la evolución de los linajes, su estudio se relacionaría más con la rama del cladismo que con el de la genética de poblaciones (Levin y Bergstrom, 2000; Maynard Smith, 1995). Si las poblaciones fueran no-clonales, se esperaría una diversidad genética elevada y escaso ligamiento entre genes, los supuestos de la genética de poblaciones encontrarían cabida, pero los análisis filogenéticos de los genes no podrían reconstruir la historia evolutiva de los individuos (Gogarten, et al., 2002; Maynard Smith, 1995).

El gran reto para estudiar la genética de poblaciones de bacterias y conocer sus relaciones evolutivas está en determinar las contribuciones relativas de los procesos evolutivos que generan la variación genética (mutaciones puntuales y recombinación) y los factores que subsecuentemente determinan sus caminos evolutivos (la selección y la deriva génica). Las relaciones entre estas fuerzas evolutivas son complejas, y pueden diferir entre y dentro especies bacterianas y entre regiones de un

genoma (Lawrence, 2002; Li, 1997; Nei y Kumar, 2000). El estudio de la recombinación en bacterias se ha basado en tres líneas de evidencia: 1) la estructura mosaico dentro de genes, que provee la evidencia molecular de eventos de recombinación intragénica, 2) el equilibrio de ligamiento entre alelos de diferentes *loci*, que provee evidencia estadística de recombinación intergénica, y 3) la comparación de los árboles genealógicos derivados de diferentes genes, que evidencia historias evolutivas diferentes para diferentes regiones del genoma (Feil y Spratt, 2001; Maynard Smith, 1995; Spratt y Maiden, 1999). Cuando los datos analizados son secuencias nucleotídicas, en algunos casos es posible trazar la historia de recombinación y determinar qué genotipos fueron los donadores y receptores (Brown *et al.*, 2002; Dykhuizen y Green, 1991) (Wang y Zhang, 2000; Yap *et al.*, 1999).

Otro aspecto importante en la evolución de las bacterias es la promiscuidad del intercambio genético. Hay reportes de recombinación homóloga entre procariontes con un nivel de divergencia en secuencia de 25%, lo cual evidencia que en procariontes puede haber intercambio genético entre linajes separados por distancias evolutivas mucho mayores que entre los eucariontes (Cohan, 1994; Feil y Spratt, 2001). La comparación del creciente número de genomas bacterianos secuenciados muestra que los genomas han experimentado cantidades significativas de transferencia lateral de información, lo que ha generado cromosomas mosaico de secuencias ancestrales y de genes adquiridos horizontalmente (Galibert, *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 1999; Perna *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2001). En el caso de bacterias con una parte significativa del genoma comprendida en plásmidos, como es el caso de muchos rizobios, el análisis de las secuencias de plásmidos completos muestra que la evolución de estos replicones está fuertemente influenciada por la ganancia y pérdida de la información genética, lo cual genera una estructura de mosaico en la que los elementos móviles como transposones y fagos parecen haber tenido un papel importante (Freiberg *et al.*, 1997; Galibert, *et al.*, 2001; Wood, *et al.*, 2001). Se han documentado muchos ejemplos de cómo la adquisición de material genético puede provocar cambios significativos en el nicho y fenotipo de una especie. Por ejemplo, la adquisición de plásmidos o islas de patogenicidad o simbiosis puede provocar el cambio entre ser simbionte comensal, patógeno o mutualista (Sullivan y Ronson, 1998; Welch, *et al.*, 2002; Wood, *et al.*, 2001). La transferencia de genes ecológicamente adaptativos permite la diversificación y especiación bacteriana, por lo que estos eventos tienen un gran impacto sobre la evolución de las poblaciones bacterianas (Lawrence, 1999). Esta es una de las grandes diferencias y ventajas del intercambio genético en bacterias con respecto al de los eucariontes; las bacterias no tienen que “reinventar la rueda” (Lawrence, 2002; Ward, 1998): la transferencia de genes, operones e islas genómicas crean nuevos linajes con combinaciones únicas

que pueden explotar nuevos nichos y generar nuevas especies o ecotipos a través de uno o unos pocos eventos evolutivos (Gogarten, et al., 2002; Lawrence, 1999; Ward, 1998).

Este tipo de eventos de recombinación y transferencia lateral son los que pudieron haber ocurrido durante la evolución de la simbiosis entre rizobios y leguminosas, y actualmente en el campo. Dentro del grupo de los rizobios existe evidencia de la transferencia de una isla (Sullivan, et al., 1996; Sullivan, et al., 1995) y plásmidos simbióticos entre especies (Amarger *et al.*, 1997; Brom *et al.*, 2002; Segovia, et al., 1991), y dentro de especies en condiciones naturales (Louvrier, et al., 1996; Schofield, et al., 1987; Wernegreen y Riley, 1999; Wernegreen, et al., 1997; Young y Wexler, 1988) y de laboratorio (Hooykaas *et al.*, 1982; Hooykaas *et al.*, 1977; Hooykaas y Schilperoort, 1984; Martínez *et al.*, 1987; Rogel *et al.*, 2001; Sivakumaran *et al.*, 1997; Truchet *et al.*, 1984). Estimaciones de desequilibrio de ligamiento han evidenciado recombinación homóloga intergénica cromosomal en poblaciones locales de *Rhizobium* (Gordon, et al., 1995; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2003; Souza, et al., 1992) y dentro de *S. meliloti*, *S. medicae* y los tipos A y B de *R. tropici* (Gordon, et al., 1995). Hay evidencia de recombinación cromosomal intergénica del gen *glnIII* entre *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Turner y Young, 2000), recombinación intragénica en el gen *rrs* entre especies de *Rhizobium* (Eardly *et al.*, 1996; Terefework *et al.*, 1998), en el gen *rriI* de especies de *Bradyrhizobium* (Parker, 2001), así como dentro del operón *rrn* (van Berkum *et al.*, 2003). La evidencia de campo y laboratorio sobre la importancia de la transferencia lateral en la evolución de los rizobios se ha reforzada por el análisis de los genomas completos y plásmidos simbióticos secuenciados (Freiberg, et al., 1997; Galibert, et al., 2001; González, et al., 2003; Kaneko, et al., 2000; Kaneko, et al., 2002; Wood, et al., 2001).

A pesar del potencial de intercambio genético en bacterias, los procariontes forman grupos fenotípicos y genéticos discretos que constituyen linajes genéticos coherentes (Cohan, 1994; Maynard Smith, 1995; Wernegreen y Riley, 1999). El equilibrio de ligamiento dentro, pero no entre grupos genéticos, sugiere restricciones genéticas a la recombinación. La interacción entre rizobios y leguminosas ofrece un modelo útil para explorar el papel de las barreras genéticas, ecológicas y espaciales sobre la recombinación entre especies bacterianas (Wernegreen y Riley, 1999).

### **I.2.2 Aislamiento sexual en bacterias**

Se plantea que la transferencia horizontal de información fue la fuerza primaria en la evolución celular (Woese, 2000), lo cual nos lleva a valorarla como una característica inherente a la evolución bacteriana. Inclusive la organización actual de los genes bacterianos en operones (grupos

de genes que se transcriben en el mismo mRNA, generalmente involucrados en una misma función (Lawrence y Roth, 1996; Snyder y Champness, 1997)) sugiere que el genoma de las bacterias ha sido evolutivamente diseñado por y para la transferencia lateral de genes (Lawrence, 2000). El modelo del operón egoísta (*selfish operon model*) plantea que la organización de los genes en grupos beneficia la adecuación de los genes constituyentes al permitirles ser regulados y transferidos conjuntamente (Lawrence, 1997; Lawrence y Roth, 1996). Se ha discutido mucho sobre el papel y la amplitud del aislamiento sexual en bacterias. La visión conservadora de que la transferencia es más frecuente entre organismos relacionados y menos frecuentes entre organismos divergentes, es la más aceptada y apoyada por las evidencias. Por lo que llamaremos aislamiento sexual a la disminución de la frecuencia del intercambio genético entre especies comparada con la que ocurre dentro de especies (Majewski, 2001). Sin embargo, el grado de aislamiento sexual depende de una multitud de factores que incluyen: diferencia en microhábitats, diferencias en sus sistemas de restricción-modificación, divergencia en secuencia y, en el caso de intercambio mediado por plásmidos, fagos o transposones, diferencias entre los rangos de hospedero de los vectores (Cohan, 1996). La transferencia lateral exitosa requiere: 1) disponibilidad de una célula donadora o DNA libre, 2) incorporación del DNA por la célula recipiente, 3) escape del DNA donador del sistema de restricción de la célula recipiente, 4) formación del DNA heteroduplex, 5) escape del heteroduplex del sistema de reparación del recipiente, 6) funcionalidad del producto en el entorno genético recipiente (Majewski, 2001). El aislamiento sexual es resultado de la probabilidad de que una o más de estas condiciones no sean satisfechas.

Para la recombinación homóloga, la divergencia en secuencia es el principal obstáculo; el grado de aislamiento genético es función de la divergencia en secuencia (Matic *et al.*, 1996; Vulic *et al.*, 1997). Sin embargo, no hay una discontinuidad obvia en esta función que pueda ser usada para definir un nivel para distinguir a las especies (Vulic, *et al.*, 1997). La recombinación ilegítima no se afecta por divergencia en secuencia, ya que no se basa en el mecanismo de recombinación homóloga, por lo que teóricamente podría ocurrir entre cualquier grupo de organismos, en este caso las demás barreras al intercambio genético (como proximidad, resistencia a mecanismos de restricción y vectores) parecen ser las más limitantes (Gogarten, *et al.*, 2002; Majewski, 2001).

No hay un consenso respecto a cuáles genes son más propensos a intercambio genético y a persistir en los genomas recipientes. Por un lado se propone que los genes más conservados en secuencia e involucrados en el mantenimiento celular, como los rRNAs, son potencialmente más propensos al intercambio genético (Cohan, 1994; Gogarten, *et al.*, 2002). Bajo esta visión, la

recombinación de genes responsables de las adaptaciones específicas de una población tiene mayor penalidad selectiva que la recombinación de genes que se consideran funcionalmente intercambiables (Cohan, 1994). Por otro lado, se argumenta que es menos probable que los genes esenciales (como los rRNAs) se transfieran exitosamente, ya que el taxón recipiente debe tener ortólogos funcionales que han coevolucionado con el resto de la maquinaria celular y es poco probable que puedan ser desplazados (*hipótesis de la complejidad* (Jain *et al.*, 1999; Woese, 2002)), mientras que los genes bajo selección baja o transitoria (no esenciales) pueden beneficiar a los linajes que los tienen, al otorgarles nuevas capacidades para explotar nuevos nichos (Gogarten *et al.*, 1999; Ward, 1998). El hecho es que, aunque los genes de un genoma pueden tener diferentes probabilidades de ser transferidos exitosamente (Gogarten, *et al.*, 2002; Jain, *et al.*, 1999; Lawrence, 2002; Woese, 2002), ninguno parece inmune a la transferencia lateral. Se han reportado casos de transferencia tanto de genes adaptativos, como islas de patogenicidad o simbiosis (Perna, *et al.*, 2001; Sullivan, *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998; Welch, *et al.*, 2002), genes involucrados en adaptaciones a alta temperatura (Nelson, *et al.*, 1999) o en resistencia a antibióticos (Dowson *et al.*, 1989; Salyers *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1992), como de genes de mantenimiento indispensables, con funciones metabólicas centrales (Doolittle *et al.*, 1990) o en la maquinaria de síntesis de proteínas (Brochier *et al.*, 2000; Eardly, *et al.*, 1996; Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Mylvaganam y Dennis, 1992; Yap, *et al.*, 1999).

Entre los grupos de bacterias existen diferentes contribuciones relativas de los tres diferentes mecanismos de transferencia lateral y el costo-beneficio de estos mecanismos parece influenciar la frecuencia de recombinación entre especies (Majewski, 2001). La transducción es el proceso más costoso, ya que los fagos matan a las bacterias. Probablemente los sistemas de restricción-modificación evolucionaron como defensas contra infecciones de fagos (Majewski, 2001). En la conjugación mediada por plásmidos o transposones, el costo asociado con la replicación y expresión de los genes adquiridos puede ser alto, ya que pueden introducir fragmentos de cientos de kilobases. Además, estos elementos llamados egoístas, pueden tener actividades antagonistas a las del cromosoma. El costo de la transformación parecer ser el menor, ya que los fragmentos integrados son menores a 10 kb. La transformación es un mecanismo codificado por el cromosoma y parece haber evolucionado específicamente como un maquinaria para adquirir nuevos genes o para reparar daños en el genoma (Levin y Bergstrom, 2000; Majewski, 2001). Sin embargo, aún en el caso de la transformación, las especies muestran preferencia por adquirir DNA de organismos cercanamente relacionados (Kroll *et al.*, 1998), lo cual sugiere que es más favorable tomar DNA de organismos cercanamente relacionados y más costoso tomarlo de organismos más divergentes. Los mecanismos



de *quorum-sensing* asociados a la transformación y conjugación son una manera de sesgar el intercambio genético hacia organismos de la misma especie (He *et al.*, 2003; Majewski, 2001; Tun-Garrido *et al.*, 2003).

El intercambio genético se reconoce como una importante fuerza de cohesión dentro de las especies y el aislamiento sexual entre ellas puede estar involucrado en los procesos de especiación. A continuación analizamos algunos de los conceptos de especie más significativos.

### **I.3 El concepto de especie en bacterias**

#### **I.3.1 Generalidades sobre los conceptos de especie**

El concepto de especie ha sido uno sobre los que más se ha escrito y uno de los que mayor controversia ha causado en la biología evolutiva (Cohan, 2002; Mayden, 1997; Mayr, 1970). El término especie se usa tanto para representar una categoría taxonómica como para representar a los individuos que se ordenan en el sistema de clasificación. Estos términos tienen dos categorías filosóficas diferentes. La categoría taxonómica de especie es una clase, que no tiene existencia real y que se usa para ordenar objetos. Las especies como individuos, están limitadas espacial y temporalmente, tienen cohesión intrínseca, se reproducen, participan en los procesos naturales y cambian con el tiempo. Gran parte de los problemas sobre los conceptos de especie se relacionan con la confusión de estos dos significados críticamente diferentes (Cohan, 2002; Mayden, 1997; Mayr, 1970). Las reglas de nomenclatura formales han reforzado la visión de las especies como clases y no como individuos. En la literatura taxonómica, sistemática y evolutiva se han desarrollado al menos unos 22 conceptos de especie. Estos conceptos pueden ser agrupados en tres clases básicas: la primera incluye a los conceptos que requieren similitud, la segunda a los que se basan en la monofilia y la tercera a los que requieren aislamiento reproductivo (Hull, 1997; Mayden, 1997). A continuación discutiremos algunos de los conceptos más utilizados y representativos, para una revisión más exhaustiva recomendamos el libro *Species: the units of biodiversity* (Claridge *et al.*, 1997).

La mayoría de los conceptos de especie están basados en similitud, entre ellos los más conocidos son los conceptos morfológico, taxonómico, fenético y ecológico. Las especies son, en el concepto morfológico (MSC) “poblaciones separadas por una discontinuidad en una serie de biotipos”, en el concepto taxonómico (TSC) “todos los especímenes que un taxónomo considere que son miembros de una misma clase”, en la definición fenética (PhSC) “el nivel de especie es aquel en el que distintos grupos fenéticos pueden ser observados”, y en la definición ecológica (EcSC) “son linajes que ocupan una zona adaptativa mínimamente diferente de la de otros linajes”. Estas

definiciones se basan en determinar que la variación de un conjunto de caracteres es menor dentro de un grupo que entre grupos, y las especies son los grupos más pequeños que exhiben el grado apropiado de similitud. Su principal problema es que no dan razones para escoger un nivel de similitud sobre otro. Además y sobre todo, estas definiciones no permiten estudiar a las especies como entidades históricas que forman linajes; el tiempo simplemente no entra en la ecuación. Si tomamos en cuenta que la evolución es un proceso que ocurre a través del tiempo, ninguna de estas definiciones puede tratar a las especies como resultado de la evolución. En gran medida se mantiene una visión fijista y esencialista pre-evolutiva (Hull, 1997; Mayden, 1997). Sin embargo, estos conceptos son aplicables a todos los organismos, por lo que han sido los más utilizados por los taxónomos y biólogos en general.

Entre los conceptos de especie basados en monofilia, el más representativo es el concepto filogenético (PSC), en el que una especie es el grupo monofilético más inclusivo definible por al menos una autoapomorfia (carácter derivado compartido). Las especies se delimitan por la distribución de caracteres diagnósticos fijos y se caracteriza por definir grupos monofiléticos. Este concepto es universalmente aplicable a todos los organismos, aunque queda la duda de si a todos los grupos monofiléticos más inclusivos se les quiere aplicar la categoría de especie. Además de la falta de un rango en el cual definir un grupo monofilético como especie, este concepto no tiene dimensión temporal, por lo que su significancia teórica está limitada (Hull, 1997; Mayden, 1997). Los conceptos basados en monofilia surgen de la creciente rama de la sistemática filogenética y de la necesidad de una definición de especie basada en linajes operacional y libre de procesos.

El concepto biológico de especie (BSC) es el más representativo de los conceptos basados en el aislamiento reproductivo, plantea que las especies son grupos de poblaciones que comparten un mismo acervo genético y que están aisladas reproductivamente de las otras especies (Mayr, 1970). La elaboración de este concepto fue fundamental en el pensamiento biológico, ya que se sustenta en la teoría evolutiva. En primer lugar, reemplaza la interpretación de las especies como clases de objetos por la de individuos con realidad y cohesión interna debida a la evolución histórica de un programa genético compartido por los miembros de la especie. En segundo lugar, provee de un criterio operacional para definir a las especies, el flujo génico y su interrupción. Sin embargo, este concepto tiene muchas desventajas para ser utilizado como concepto de especie. Muchas de estas desventajas han sido revisadas exhaustivamente (Cohan, 2002; Hull, 1997; Mayden, 1997), por lo que sólo mencionaremos que una de las mayores deficiencias del BSC es que no es universalmente aplicable,

todos los organismos con reproducción asexual quedan excluidos, es un concepto relativista (una especie existe en función de otra) y con poca perspectiva de linaje (Hull, 1997; Mayden, 1997).

Un concepto de especie que tiene gran importancia teórica y que no cae en ninguna de las categorías antes descritas es el concepto evolutivo de especie (ESC). Este concepto se desarrolló para introducir dimensionalidad y universalidad al concepto de especie empleado en biología. Bajo este concepto, una especie es un linaje que evoluciona separadamente de otros, que tiene sus propias tendencias y papeles evolutivos. Esta definición de especie es universalmente aplicable, tiene perspectiva de linaje y se fundamenta en la teoría de la evolución. El principal problema que presenta este concepto es que es operacionalmente difícil, ya que se plantea que es la evolución la que produce linajes con identidad y cohesión, y este proceso es difícil de medir (Hull, 1997; Mayden, 1997).

Para introducir mecanismos operacionales en el ESC, se creó el concepto cohesivo de especie (CSC), en el que una especie es un linaje evolutivo cuyos límites surgen por fuerzas genéticas y ecológicas que crean comunidades reproductivas cohesivas. Bajo esta definición, la tarea básica del investigador es identificar los mecanismos de cohesión que mantienen a un grupo como un linaje evolutivo (Templeton, 1989). Sin embargo, las definiciones científicas teóricas no suelen introducir los criterios de aplicación en sus definiciones; el incluir mucha terminología o datos empíricos dentro del cuerpo de una definición puede ser contraproducente (Hull, 1997), por lo que consideramos que el concepto evolutivo (ESC) provee de una definición evolutiva más clara.

El concepto de especie debe ser aplicable a todos los organismos, debe ser lo más operacional posible y debe estar fundamentado en las teorías biológicas aceptadas (Hull, 1997). Al analizar las diferentes concepciones sobre las especies vemos que en los conceptos existe un compromiso entre estas tres características. Así por ejemplo, en la mayoría se sacrifica la fundamentación teórica por la operacionalidad y universalidad (conceptos basados en similitud y monofilia), y en otros se sacrifica la universalidad por la fundamentación teórica u operacionalidad (BSC) (Hull, 1997; Mayden, 1997). En este sentido estamos de acuerdo con Hull (1997) en que hasta el momento no se ha generado un concepto de especie que sea ideal en todos los sentidos, ya que todos tienen alguna debilidad. Sin embargo, dada la necesidad teórica y práctica de contar con un cuerpo teórico que nos permita manejar la diversidad biológica, es necesario establecer un concepto de especie que pueda ser aplicado a la totalidad del mundo vivo. La solución no es agrupar distintos componentes de varios conceptos. Por el contrario, el agrupar criterios discordantes en un solo concepto ha generado en gran medida el debate alrededor del concepto de especie (Mayden, 1997). Consideramos que entre los distintos conceptos de especie, el concepto evolutivo (ESC) es superior, ya que tiene fundamento

teórico y es aplicable a todo el mundo vivo. Es el único que es consistente con el conocimiento teórico y empírico que tenemos sobre la diversificación del mundo vivo, es consistente con el estatus de individuo de las especies y engloba a todos los tipos de entidades biológicas. El principal inconveniente que tiene es que es poco operacional en su definición, por lo que, estamos de acuerdo con Mayden (1997) en que el ESC sea utilizado como el concepto de especie primario y que los demás sean aplicados como conceptos secundarios supeditados al concepto primario.

Planteamos que el ESC es el concepto de especie que debe adoptarse para analizar la diversidad biológica, que la evolución debe ser el principal criterio para definir a las especies y que mientras más evidencia se obtenga a través de los demás conceptos de especies, más sólido será nuestro conocimiento sobre los límites de las especies.

### **1.3.2 Los conceptos de especie en bacterias**

El desarrollo de técnicas cada vez más avanzadas para explorar la diversidad microbiana nos ha permitido conocer con mucha mayor profundidad la biología de las bacterias. Estas herramientas nos han dado luz sobre la complicada manera en que este enorme grupo de organismos se organiza, desde el nivel ecológico hasta el molecular. El desarrollo de técnicas que permiten conocer la diversidad bacteriana no cultivable y la observación *in situ* de las comunidades microbianas, ha abierto nuevos horizontes en la ecología microbiana (Amann y Kuhl, 1998; Amann *et al.*, 1995; Ward, 1998). El desarrollo de las técnicas de análisis y modificación genética y la automatización de la secuenciación de DNA han arrojado una gran cantidad de datos sobre la dinámica genómica de las bacterias (Doolittle, 2002; Levin y Bergstrom, 2000).

Con los nuevos métodos de genética molecular, la evolución de algunas poblaciones bacterianas naturales se ha podido seguir de cerca. Podemos citar dos ejemplos conocidos, el surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos, inducida por la adquisición de plásmidos y transposones de multiresistencia (Salysers, *et al.*, 1995), y el surgimiento de bacterias simbióticas a través de la adquisición de la isla simbiótica de bacterias inoculadas (Sullivan, *et al.*, 1995). Asimismo, la evolución experimental ha arrojado luz sobre algunos de los mecanismos que operan en la evolución bacteriana; podemos citar el trabajo de evolución experimental en *E. coli*, que muestra el proceso adaptativo de poblaciones aisladas y sujetas a las mismas condiciones (Lenski, 1995; Lenski y Travisano, 1994), y el efecto de un ambiente homogéneo o heterogéneo sobre la diversidad morfológica de *Pseudomonas* (Rainey y Travisano, 1998).

Actualmente existen más de 100 genomas bacterianos completamente secuenciados ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Su análisis comparativo ha mostrado la gran plasticidad genómica y genética de las bacterias, también ha mostrado que el genoma bacteriano es un mosaico y que la transferencia lateral de información genética juega un papel importante en su evolución (Doolittle, 2002; Lawrence, 1999). Una conclusión derivada del mosaicismo presente en los genes y genomas de las bacterias es que las filogenias derivadas de un solo gen no necesariamente reflejan la historia evolutiva de los organismos (Doolittle, 2002; Nelson, et al., 1999). Esa conclusión tiene fuertes repercusiones sobre la sistemática bacteriana, ya que ésta se basa en gran medida en las relaciones filogenéticas de un solo gen, el gen *rrs*.

Aún con el gran avance que han experimentado recientemente las áreas de la ecología y evolución bacteriana, el concepto de especie empleado en bacteriología se ha mantenido al margen de muchos de estos descubrimientos (Cohan, 2002). La sistemática bacteriana no ha incorporado los conceptos de especie basados en teorías evolutivas. El Comité Internacional de Sistemática Bacteriana es el encargado de establecer y recomendar los estándares mínimos para la descripción válida de especies bacterianas y pretende proveer a los bacteriólogos de una definición uniforme de especie procarionte (Stackebrandt *et al.*, 2002). En la última nota taxonómica publicada por el comité, las especies se definen de manera pragmática, operacional y universalmente aplicable: una especie es una categoría que circunscribe un grupo (preferentemente) genómicamente coherente de aislados individuales que comparten un alto grado de similitud en (varias) características independientes, probadas bajo condiciones altamente estandarizadas. La similitud DNA:DNA se mantiene como el parámetro reconocido para delinear especies. Se ha adoptado un nivel de 70% de similitud como el estándar reconocido (*gold standard*) para determinar si dos cepas pertenecen a la misma especie y se ha utilizado el 3% de divergencia en secuencia del gen *rrs* como punto de corte para separar especies (Stackebrandt, et al., 2002; Stackebrandt y Goebel, 1994). Así en bacteriología se ha usado un concepto de especie arbitrario (Maynard Smith, 1995; Ward, 1998). Es un concepto generado *ad hoc* para bacterias y no es aplicable a todos los seres vivos, si se aplicara este concepto de especie a otros seres vivos encontraríamos que, por ejemplo, todos los primates pertenecemos a la misma especie (Maynard Smith, 1995; Ward, 1998).

La definición de especie bacteriana actual se basa en el diagnóstico de similitud entre cepas. La concepción tipológica de las especies es persistente en bacteriología, ya que las especies se siguen considerando entidades estáticas (que no evolucionan) definidas por atributos típicos o esenciales (Mayr, 1970; Ward, 1998). Se designan cepas tipo y sus caracteres fenotípicos y genotípicos se

consideran típicos de todos los organismos que pertenecen a esa especie. El concepto tipológico ignora el hecho de que las especies están compuestas de poblaciones naturales que están integradas por una organización interna y que esta organización da a las poblaciones una estructura que va más allá de una mera agregación de individuos (Mayr, 1970). El reemplazo del pensamiento tipológico por el pensamiento poblacional ha sido una de las mayores revoluciones conceptuales en biología (Mayr, 1970), pero al parecer ésta no ha llegado a la sistemática bacteriana.

En la definición de especie actual no se incluyen las nuevas evidencias y visiones sobre la evolución bacteriana, pero algunos biólogos evolutivos han tratado de proponer conceptos de especie bacteriana basados en teorías evolutivas y ecológicas. A principios de la década pasada, Dykhuizen y Green (1991) propusieron que se puede aplicar el concepto biológico de especie a las bacterias. Sugieren que las bacterias se pueden delimitar como grupos de cepas que recombinan entre sí pero no con cepas de otros grupos y proponen una aproximación filogenética, basada en secuencias de varios *loci*, para identificar los grupos que han, o no han, intercambiado genes (Dykhuizen y Green, 1991). Esta propuesta tiene la ventaja de incorporar la teoría evolutiva a la sistemática bacteriana. Sin embargo, como ya mencionamos, el concepto biológico de especie *per se* tiene varios inconvenientes para ser usado como un concepto de especie en general. Dykhuizen y Green (1991) hacen el esfuerzo de acoplar este concepto de especie a bacterias con una estructura genética no totalmente clonal, como *E. coli*, pero además de que pueden existir organismos del todo clonales, la rareza y la promiscuidad en el intercambio genético entre bacterias hace que el concepto biológico de especie no pueda ser aplicado ampliamente en este grupo de organismos (Cohan, 1994; Cohan, 2002).

Cohan (2002) argumenta que el intercambio genético en bacterias no puede evitar la divergencia, dada su rareza y promiscuidad, y plantea que el aislamiento sexual es irrelevante para la evolución de divergencia permanente en el mundo bacteriano (Cohan, 1996). Bajo esta visión, las especies asexuales están sujetas a su propia fuerza de cohesión, la selección natural que purga la diversidad genética dentro de las poblaciones, fenómeno conocido como selección periódica. Una nueva especie se forma cuando una línea asexual evoluciona hacia la adaptación a un nuevo nicho ecológico, de modo que la nueva especie no puede afectarse por los alelos adaptativos de otra población. Una vez que las poblaciones son lo suficientemente divergentes como para escapar de los eventos de selección periódica de cada una, pueden divergir permanentemente y alcanzan el estatus de especie, es decir, son ecológicamente distintas y están irreversiblemente separadas (Cohan, 2001; Cohan, 2002). Cohan (2002) apunta que estas propiedades universales de las especies no están presentes en las especies nombradas por los sistemáticos, sino en los ecotipos, que son organismos

que ocupan el mismo nicho ecológico, cuya divergencia es purgada recurrentemente por selección natural. Las especies nombradas contienen varios ecotipos, por lo que propone que se les reconozca utilizando una clasificación latina trinomial, nombrando su género, especie y ecotipo (Cohan, 2002).

Cohan (2002) propone que la manera de descubrir los ecotipos es mediante información sobre los nichos ecológicos de las bacterias y el análisis de secuencias de varios genes de mantenimiento (no involucrados en las adaptaciones específicas de nicho y presumiblemente intercambiables entre distintos grupos ecológicamente distintos), conocido como el MLST (multilocus sequence typing). Se espera que cada ecotipo sea identificable como un grupo de secuencias monofiléticas, donde la divergencia promedio entre ecotipos sea mayor que la divergencia promedio dentro de ellos. Cohan (2002) reconoce que el problema es determinar a qué nivel los subgrupos corresponden a ecotipos, y propone el método de “star clade”, desarrollado por su grupo, en el que un ecotipo se identifica como el grupo de cepas más grande cuya filogenia contiene un nodo significativo o cuando mucho dos. El análisis de “star clade” permite demostrar que los complejos clonales formados por el análisis de MLST son ecotipos con las propiedades de una especie (Cohan, 2002).

La propuesta de Cohan (2002) identifica a las especies como grupos monofiléticos que comparten una historia evolutiva de selección ecológica y da luz sobre algunos de los posibles mecanismos de especiación. Sin embargo, su propuesta tiene varias debilidades: 1) la teoría evolutiva detrás de este concepto puede ponerse en duda, ya que está basada en el modelo clonal, 2) no toma en cuenta que muchos caracteres adaptativos están codificados en elementos móviles extracromosomales, y 3) los métodos que propone tienen supuestos que no necesariamente se cumplen en todos los casos, además de ser inaccesibles para la mayoría de los investigadores. La propuesta de introducir en la sistemática bacteriana el concepto de clona, complejo clonal o ecotipo dentro de una especie, ya existía (Lan y Reeves, 2001). Esta propuesta se generó en el sentido de incluir ecotipos que en la actualidad se consideran especies o incluso géneros distintos, dentro de una misma especie, como el caso de muchos patógenos humanos (Lan y Reeves, 2001). Por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* son clonas de una misma especie (Helgason *et al.*, 2000) y las especies de *Shigella* son clonas dentro de *E. coli* (Pupo *et al.*, 2000). Es importante que se reconozcan estas unidades ecológicas y evolutivas. Sin embargo, creemos que las especies, como conjunto de ecotipos, son la unidad evolutiva principal. Las clonas forman parte de la totalidad de la especie, a escala ecológica estructuran las poblaciones y a escala evolutiva contienen la diversidad genética de la especie. Las clonas o ecotipos nacen y se extinguen, así como los individuos y las especies. Creemos que la introducción de los ecotipos en la nomenclatura de las especies bacterianas

es plausible, y de hecho se hace, como en el caso de serotipos, biovariedades, subespecies, etc. Sin embargo, no es válido transferirles los atributos de la categoría y el concepto de especie. Por ejemplo, dentro de la especie *R. etli* se reconocen tres ecotipos: los no simbióticos aislados del suelo, la biovariedad *phaseoli*, aislada de nódulos de frijol, y la biovariedad *mimosae*, aislada de nódulos de mimosas (Segovia, et al., 1991; Wang *et al.*, 1999). Segovia et al. (1991) demostraron que la transferencia del plásmido simbiótico de la biovar *phaseoli* convertía en simbióticos a los *R. etli* no simbióticos (Segovia, et al., 1991). Dentro de la población de *R. etli* bv. *phaseoli* que estudiamos en el presente trabajo, encontramos un aislado con un alelo simbiótico del tipo de la bv. *mimosae*. Estos ejemplos nos permiten ver cómo los diferentes ecotipos se relacionan y mantiene la dinámica evolutiva dentro de una especie.

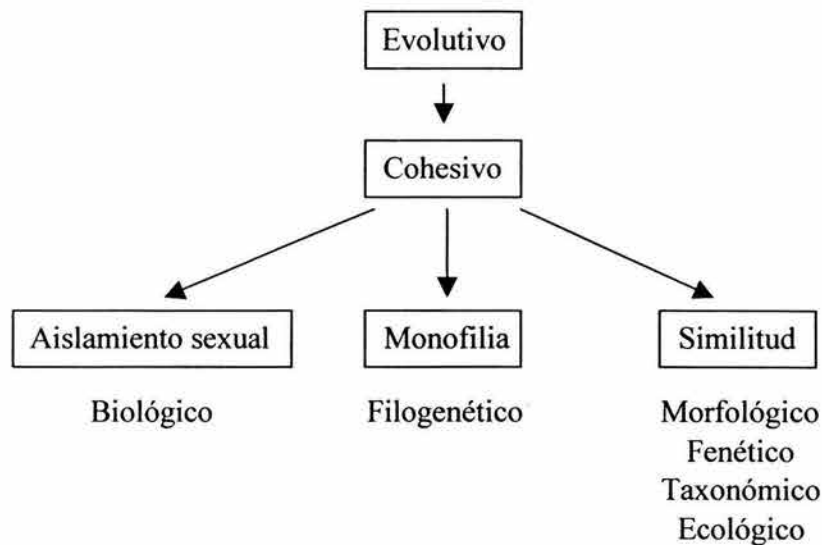
En la taxonomía actual de las bacterias que nodulan las raíces o tallos de leguminosas, se propone que la descripción de las especies de rizobios debe hacerse en base a caracteres genotípicos y fenotípicos, usando el llamado enfoque polifásico (Vandamme *et al.*, 1996). Se consideran caracteres fenotípicos como su capacidad simbiótica, sus características morfológicas y de cultivo, y caracteres genotípicos como su similitud DNA:DNA y sus relaciones filogenéticas basadas en el gen *rrs* (Graham *et al.*, 1991; van Berkum y Eardly, 1998). La base racional de utilizar este enfoque polifásico es que mientras mayor sea el porcentaje del genoma considerado en la clasificación mayor será la precisión obtenida (Vandamme, et al., 1996). El concepto de especie polifásico es actualmente el más empleado para la delimitación de los taxones bacterianos (Goodfellow *et al.*, 1997; Stackebrandt, et al., 2002; Vandamme, et al., 1996). Este es un concepto operacionalmente práctico, pero adolece de una visión evolutiva de la diversidad bacteriana.

### **I.3.4 Una propuesta sobre el concepto de especie**

Creemos que existe un nivel de organización en todos los seres vivos que merece ser reconocido como el nivel de especie, que el concepto de especie debe ser aplicable a todos los seres vivos (universal), y que no es válido crear conceptos de especie que sean aplicables solamente a cierto grupo de organismos. El concepto evolutivo de especie (ESC) tiene la característica de ser un concepto en el que las especies son tratadas como linajes que se extienden a través del tiempo, por lo que consideramos que éste debe ser el concepto de especie empleado en biología. Este concepto tiene la capacidad de incluir el conocimiento que tenemos sobre la evolución bacteriana, en particular, el papel fundamental del intercambio genético: tenemos que aceptar que las especies no son sistemas cerrados y que el grado de apertura varía de especie a especie. El impacto de este concepto sobre la



bacteriología es sobre todo teórico: es necesario que se reconozca la enorme capacidad evolutiva de las bacterias y las diferencias que existen entre grupos. Creemos que los métodos clásicos utilizados en la delimitación de especies son útiles para evaluar la similitud entre cepas, pero el imponer puntos de corte arbitrarios para delimitar a las especies no es válido. Debe tomarse en cuenta que los niveles de variación y los mecanismos de evolución son cambiantes dentro de diferentes grupos de organismos. Debe analizarse con mayor amplitud la variación genética, las relaciones filogenéticas y los caracteres y mecanismos ecológicos que son responsables de la evolución de las poblaciones y del mantenimiento de la cohesión de las especies. Como ya mencionamos, proponemos que el concepto evolutivo de especie (ESP) debe ser el concepto primario y que los demás conceptos pueden ser utilizados como conceptos secundarios. La versión operacional del concepto evolutivo, el concepto cohesivo (CSC), es el concepto de especie que puede aportar la guía para estudiar los aspectos genéticos y ecológicos que dan cohesión a las especies, por lo que pensamos que debe ser el concepto secundario que en primera instancia se analice, y que éste puede dar pautas para la aplicación de otros conceptos. El enfoque polifásico utilizado actualmente, así como otros conceptos de especie, como el biológico (BSC) y el ecológico (EcSC), pueden ser útiles para conocer la variación genética y ecológica de las especies de bacterias, pero la conceptualización de las especies debe estar guiada por el concepto evolutivo (Esquema 1).



**Esquema 1.-** Representación de la organización jerárquica de los principales conceptos de especie.

## **I.4 Marcadores genéticos y evolución molecular**

### **I.4.1 Evolución molecular**

En el estudio de la evolución se plantean dos problemas principales, uno es clarificar las historias evolutivas de los organismos y el otro es entender los mecanismos de evolución (Hillis *et al.*, 1996; Nei, 1987). Estos dos problemas han sido abordados por dos ramas de la biología evolutiva: la sistemática y la genética de poblaciones.

La sistemática es una de las áreas más controvertidas de la biología. La delineación de especies, géneros, familias y demás rangos taxonómicos, es generalmente subjetiva. La filogenética es menos controvertida, ya que tiene que ver con las relaciones evolutivas de los organismos, siendo secundaria la asignación de los organismos a un rango taxonómico (Nei y Kumar, 2000). Ambas están relacionadas, ya que la clasificación de los organismos debe reflejar sus historias evolutivas, por lo que la filogenética puede desarrollar una base científica para la sistemática.

Dado que el “archivo evolutivo” de todos los organismos está escrito en el DNA, es posible estudiar las relaciones evolutivas de los organismos comparando sus DNAs (Hillis, *et al.*, 1996; Li, 1997). Este enfoque tiene varias ventajas sobre el enfoque clásico que usa caracteres morfológicos y fisiológicos. Los datos de secuencias de DNA representan el nivel más alto de resolución genética y permiten el desarrollo de métodos estadísticos más poderosos (Li, 1997; Nei y Kumar, 2000). Sin embargo, es importante enfatizar que el análisis de la secuencia de un gen no necesariamente representa de la historia evolutiva del organismo completo. El análisis de genes nos muestra la historia evolutiva de cada uno de ellos. Las fuerzas evolutivas no operan de la misma manera sobre todos los genes (Hillis, *et al.*, 1996; Li, 1997; Nei y Kumar, 2000). Los genes de un genoma están sujetos de manera diferente a la acción de las diversas fuerzas evolutivas, por lo que se generan tasas y patrones de evolución diferentes.

En el estudio de la evolución es importante conocer la cantidad de variación genética dentro y entre especies, para entender qué tipo de variación es importante para la formación de nuevas especies (Hillis, *et al.*, 1996). Sabemos muy poco sobre el mecanismo de especiación o de la evolución del aislamiento reproductivo, pero es relativamente fácil evaluar la cantidad de variación genética dentro y entre poblaciones a nivel molecular (Nei y Kumar, 2000). Los marcadores moleculares son útiles para cuantificar la diversidad genética, monitorear la dispersión de organismos y sus genes, y trazar sus relaciones filogenéticas (Avice, 1994; Lenski, 1995). Sin embargo, las moléculas son algo más que marcadores; están involucradas en la adecuación de los organismos, por lo que entender las consecuencias de la variación molecular es un problema central en ecología

(Awise, 1994; Lenski, 1995). Esta última problemática queda fuera del alcance del presente trabajo; sin embargo, es necesario tomar en cuenta las funciones en las que están involucradas las moléculas que utilizamos como marcadores, para poder analizar con mayor fundamento los resultados y las conclusiones que de éstos se puedan derivar.

#### **I.4.2 Marcadores empleados en este estudio**

En este trabajo analizamos los patrones de evolución molecular de 3 genes cromosomales involucrados en el metabolismo central celular (*rrs*, *glnII* y *atpD*) y 2 genes plasmídicos involucrados en la simbiosis con plantas (*nifH* y *nodB*). Los *loci* cromosomales son genes indispensables de mantenimiento, mientras que los *loci* plasmídicos son genes adaptativos que permiten la colonización del nicho del nódulo. Por lo tanto suponemos que la variación de los *loci* cromosomales puede considerarse selectivamente neutral, mientras que la variación en *loci* simbióticos puede estar sujeta a selección ambiental.

##### **I.4.2.1 *rrs*:**

Los RNAs ribosomales son parte estructural de los ribosomas, que son la maquinaria de síntesis de proteínas en todos los organismos. La subunidad pequeña del ribosoma (30S en bacterias) está constituida por 21 proteínas diferentes y el rRNA 16S. La subunidad grande está constituida por 31 proteínas y los rRNAs 23S y 5S. Para que la traducción de proteínas pueda iniciar, la subunidad 30S tiene que unirse al mRNA. Precediendo al codón de iniciación hay unos pocos nucleótidos que definen el sitio de unión al ribosoma, formando la secuencia Shine-Dalgarno, que es complementaria a secuencias cortas del rRNA 16S, lo cual permite alinear en el marco de lectura adecuado el mRNA (Snyder y Champness, 1997). Dada la función central de los ribosomas en la síntesis de proteínas y el gran número de interacciones que el rRNA tiene con los otros componentes del ribosoma y el mRNA, el número de mutaciones que el gen *rrs* puede aceptar son muy pocas (Woese, 1987). Lo anterior aunado a la degeneración del código genético, explica que el rRNA evolucione más lentamente en comparación con los genes que codifican para proteínas (Nei y Kumar, 2000; Page y Holmes, 1998). El rRNA 16S tiene una estructura secundaria compleja: el transcrito de ~1,500 pb se pliega sobre sí mismo y se aparean las bases complementarias para formar alrededor de 50 tallos helicoidales con algunas regiones no apareadas llamadas asas (Woese, 1987). Las sustituciones nucleotídicas en los tallos requieren del cambio simultáneo de las bases complementarias, que pueden estar distantes en la estructura primaria. Dado que en las asas las bases no están apareadas, éstas pueden interactuar con

otras moléculas del aparato de síntesis de proteínas, por lo que la composición de las horquillas tiende a ser más conservada que la de los tallos de función más bien estructural, aunque también algunos tallos son más variables que otros (Woese, 1987).

El gen *rrs* se ha usado para reconstruir filogenias moleculares profundas, porque está presente en todos los organismos, muestra un alto grado de constancia funcional, es grande y está compuesto por muchos dominios funcionales (Weisburg, et al., 1991; Willems y Collins, 1993; Woese, 1987). Se asume que los cambios en la secuencia del rRNA son selectivamente neutrales y que, debido a que el rRNA está integrado en un sistema funcional complejo, no está sujeto a transferencia lateral (*hipótesis de la complejidad* (Jain, et al., 1999; Woese, 1987; Woese, 2000)).

El gen *rrs* se ha convertido en uno de los marcadores moleculares más usados en la sistemática de bacterias (Goodfellow, et al., 1997; Ludwig y Schleifer, 1994). Tiene la ventaja de que segmentos altamente conservados contienen información a niveles taxonómicos altos (dominios y *phyla*) y regiones menos conservadas permite analizar niveles taxonómicos bajos (familias, géneros y especies). Se considera que los árboles filogenéticos basados en la secuencia del *rrs* reflejan globalmente la historia evolutiva de los organismos (Ludwig *et al.*, 1998; Ludwig y Schleifer, 1994; Woese, 1987).

Sin embargo, algunos de los supuestos utilizados para reconstruir la historia evolutiva de los organismos a partir de los genes de rRNA no son totalmente válidos. El que este gen esté restringido funcionalmente no necesariamente implica que no está sujeto a selección ambiental. Se sabe que pueden haber cambios selectivos para generar resistencia a antibióticos cuyo blanco son los ribosomas (Mankin, 1997; Snyder y Champness, 1997). El que el rRNA forme parte de una maquinaria compleja no necesariamente implica que no está sujeto a transferencia lateral. De hecho, varios análisis de las secuencias del gen *rrs* han mostrado evidencia de transferencia lateral y recombinación en diversos grupos de bacterias, como en *Aeromonas* (Martínez-Murcia, et al., 1992; Sneath, 1993), en Rhizobiaceae (Eardly *et al.*, 1995; Eardly, et al., 1996; Terefework, et al., 1998; van Berkum, et al., 2003), el actinomiceto *Thermomonospora chromogena* (Yap, et al., 1999), y en otras especies y géneros de actinomicetos (Wang y Zhang, 2000). En este último trabajo Wang y Zhang (2000) discuten que aunque la hipótesis de la complejidad es correcta, no toma en cuenta que los genes no son las unidades más pequeñas de transferencia. Por lo que proponen la hipótesis de la complejidad simplificada, en la que la transferencia de dominios dentro de un gen puede mantener la función adecuada del gen, para explicar cómo la transferencia lateral puede afectar a genes altamente conservados y esenciales. En consecuencia, esto permite explicar las incongruencias generadas por el

análisis de diferentes segmentos del gen *rrs* en análisis filogenéticos (Terefework, et al., 1998; Wang y Zhang, 2000).

Además de lo anterior, los genes de rRNA tienen otros inconvenientes para ser utilizados en reconstrucciones filogenéticas. Muchas bacterias tienen más de un operón y hay evidencia de diferencias entre operones en las posiciones altamente variables en algunos grupos (Haukka *et al.*, 1996; Mylvaganam y Dennis, 1992; Yap, et al., 1999), y los patrones de sustitución de estos genes violan algunos supuestos de los modelos de reconstrucción filogenética, como el de la independencia entre sitios (Li, 1997; Nei y Kumar, 2000). El gen *rrs* tiene la limitación de cualquier otro gen de no necesariamente reflejar la historia evolutiva del organismo.

#### **1.4.2.2 *glnII*:**

La glutamino sintetasa es una enzima clave en la asimilación del nitrógeno de la que se han encontrado tres isoformas. La GSI es la forma que se ha encontrado sólo en procariontes. La GSII está presente en todos los eucariontes y en algunos procariontes, como los rizobios. La GSIII se ha encontrado sólo en rizobios, está lejanamente relacionada con las otras dos formas y puede no ser un homólogo funcional (Taboada *et al.*, 1996; Turner y Young, 2000). La GSII es un octámero de subunidades idénticas que se encuentra en el citoplasma y cataliza la condensación de glutamato y amonio a glutamina.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de GSI y GSII han mostrado que estos genes se comportan como relojes moleculares “ideales” (Pesole *et al.*, 1991). Las segundas posiciones de las GSs cumplen con la condición de tener las mismas frecuencias de bases, por lo que se han usado para calcular tiempos de divergencia tan lejanos como entre procariontes y eucariontes. La calibración de los árboles indica que la GSI y GSII son resultado de una duplicación que ocurrió hace alrededor de 2,500 millones de años (Ma) y que la separación de la GSII de plantas y bacterias ocurrió hace alrededor de 1,260 Ma (Pesole *et al.*, 1995). Estudios de las GSI y GSII de rizobios han mostrado que la GSI está muy conservada en la familia y que la GSII muestra mayor variabilidad, por lo que se ha propuesto usar la GSII como marcador taxonómico dentro del grupo de los rizobios (Taboada, et al., 1996; Turner y Young, 2000; Wernegreen y Riley, 1999). Las secuencias nucleotídicas de la GSII han sido utilizadas para comparar la dinámica de los *loci* cromosomales de mantenimiento y los simbióticos de poblaciones de rizobios (Wernegreen y Riley, 1999), y para calcular los tiempos de divergencia de los distintos géneros dentro de la familia (Turner y Young, 2000).

### **I.4.2.3 *atpD*:**

El gen *atpD* codifica para la subunidad  $\beta$  de la ATP sintetasa. La ATPasa es un complejo enzimático que consiste de dos subunidades. La subunidad catalítica  $F_1$ , que incluye a las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , se encuentra en la superficie citoplasmática de la membrana y es la que sintetiza o hidroliza ATP. La subunidad integral de la membrana  $F_0$  atraviesa la membrana formando un canal para el transporte de protones y está constituida por las subunidades a, b y c (Boyer, 1997). La ATPasa es un complejo proteico clave en el metabolismo energético, ya que produce todo el ATP necesario para el metabolismo celular. Recientemente, el gen *atpD* ha empezado a ser empleado como marcador molecular en estudios filogenéticos en bacterias (Christensen y Olsen, 1998; Gaunt *et al.*, 2001).

### **I.4.2.4 *nifH*:**

El gen *nifH* codifica para la nitrogenasa reductasa o subunidad férrica de la nitrogenasa (Long, 1989; Long, 2001). El complejo de la nitrogenasa contiene dos enzimas: la nitrogenasa, compuesta por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , codificadas por *nifD* y *nifK*, respectivamente, y la nitrogenasa reductasa, compuesta por dos subunidades idénticas codificadas por *nifH* (Quinto *et al.*, 1985). A diferencia de los genes de nodulación, la nitrogenasa se encuentra en muchas otras bacterias, incluidas arqueobacterias, lo cual evidencia la evolución temprana de la fijación de nitrógeno (Sprent, *et al.*, 1987). Esta es una enzima muy conservada entre los linajes de bacterias fijadoras de nitrógeno. Desde un punto de vista evolutivo, no está claro si los genes *nif* son parte del genoma normal (core) de los rizobios o si fueron adquiridos junto con los genes *nod* (Broughton y Perret, 1999; Haukka *et al.*, 1998; Hennecke, *et al.*, 1985; Laguerre, *et al.*, 2001; Young y Johnston, 1989). Sin embargo, análisis filogenéticos de estos genes en poblaciones de rizobios evidencian discordancia entre *nifH* y *rrs*, lo que sugiere que la transferencia lateral de los genes *nif* dentro de las especies o géneros de rizobios tiene un papel importante en poblaciones naturales (Eardly *et al.*, 1992; Haukka, *et al.*, 1998). El gen *nifH* se ha utilizado ampliamente en la identificación y clasificación de los rizobios, sobre todo a nivel de biovariedad (Amarger, *et al.*, 1997; Graham, *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1985).

### **I.4.2.5 *nodB*:**

Los genes *nod* codifican para enzimas involucradas en la síntesis y secreción de los factores de nodulación, que actúan como determinantes de la especificidad de hospederos y permiten la formación de los nódulos fijadores de nitrógeno (Long, 1989; Long, 2001; van Rhijn y Vanderleyden,

1995; Vanderleyden, 1998). Los factores de nodulación son moléculas compuestas por un esqueleto de quitina unido a una cadena de ácido graso. Los genes *nodABC* son genes indispensables para la nodulación, ya que se encargan del ensamble del esqueleto de los factores de nodulación. NodC es una proteína integral de la membrana interior que polimeriza los residuos de N-acetilglucosamina; la longitud del esqueleto de los factores de nodulación está determinada por NodC, por lo que puede tener importancia en las relaciones de especificidad de hospedero. NodB deacetila el residuo terminal de la glucosamina, dejando un grupo amino libre que es acilado por NodA. El tipo de grupos acilo que las proteínas NodA unen puede introducir cierta especificidad a los factores de nodulación. Otros genes *nod* se consideran hospedero específico (*hsn*) y se relacionan con la modificación de residuos sustituyentes en los factores de nodulación; éstos pueden ser incluso cepa específicos (Long, 1989; Long, 2001; van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Vanderleyden, 1998). Los genes *nod* se han encontrado únicamente en los rizobios, sus relaciones filogenéticas son muy semejantes entre ellos, pero difieren de las filogenias basada en el gen *rrs*, por lo que parecen haber sido transferidos entre genotipos cromosomales divergentes (Laguerre, et al., 2001; Ueda, et al., 1995; Wernegreen y Riley, 1999). Estudios recientes que comparan las filogenias derivadas de genes cromosomales y simbióticos, muestran evidencia de transferencia lateral de los genes *nod* comunes dentro de los distintos linajes cromosomales de los rizobios y que las filogenias de los genes *nod* son similares a las de las plantas hospederas (Laguerre, et al., 2001; Wernegreen y Riley, 1999).

---

## **CAPITULO II.- *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics and biogeographic implications**

### **II.1 Resumen**

En este trabajo estudiamos la estabilidad de la estructura genética durante tres años consecutivos de poblaciones de los rizobios aislados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* cultivado en una parcela de milpa manejada tradicionalmente en México. El conjunto de marcadores genéticos analizados (incluyendo secuencias parciales de *rrs*, *glnII*, *nifH* y *nodB*), junto con experimentos de rango de hospedero, ubicaron a los aislados dentro de las especies *R. etli* bv. *phaseoli* y *R. gallicum* bv. *gallicum*. El análisis de grupos de los datos de electroforesis de enzimas multilocus y de los perfiles de plásmidos separaron a las dos especies e identificaron clonas numéricamente dominantes dentro de cada especie. Los análisis de genética de poblaciones mostraron una alta diferenciación entre las dos especies y poca diferenciación dentro de ellas a lo largo de los tres años. Los resultados de los análisis de desequilibrio de ligamiento mostraron una estructura genética epidémica para ambas especies, con intercambio genético frecuente dentro de poblaciones conespecíficas pero no entre las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum*. A partir de los resultados anteriores, se seleccionó una submuestra de 34 aislados que se utilizó para análisis de PCR-RFLP del rRNA 16S, determinación del número de copias *nifH*, y experimentos de rango de hospedero. Los perfiles de plásmidos y los patrones de hibridación *nifH* sugieren la transferencia lateral de plásmidos entre distintos genotipos multilocus dentro de las especies pero no entre ellas. Ambas especies se recuperaron de nódulos de las mismas plantas, indicando que mecanismos diferentes al aislamiento por hospedero, espacial o temporal deben dar cuenta de la barrera genética entre ellas. Por último, se discuten las implicaciones de haber encontrado a *R. gallicum* bv. *gallicum* nodulando frijol en América.



## *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications

Claudia Silva,<sup>1\*</sup> Pablo Vinuesa,<sup>2</sup> Luis E. Eguiarte,<sup>1</sup> Esperanza Martínez-Romero,<sup>2</sup> and Valeria Souza<sup>1</sup>

Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510,<sup>1</sup> and Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos,<sup>2</sup> Mexico

Received 22 July 2002/Accepted 14 November 2002

The stability of the genetic structure of rhizobial populations nodulating *Phaseolus vulgaris* cultivated in a traditionally managed milpa plot in Mexico was studied over three consecutive years. The set of molecular markers analyzed (including partial *rrs*, *glnII*, *nifH*, and *nodB* sequences), along with host range experiments, placed the isolates examined in *Rhizobium etli* bv. phaseoli and *Rhizobium gallicum* bv. gallicum. Cluster analysis of multilocus enzyme electrophoresis and plasmid profile data separated the two species and identified numerically dominant clones within each of them. Population genetic analyses showed that there was high genetic differentiation between the two species and that there was low intrapopulation differentiation of the species over the 3 years. The results of linkage disequilibrium analyses are consistent with an epidemic genetic structure for both species, with frequent genetic exchange taking place within conspecific populations but not between the *R. etli* and *R. gallicum* populations. A subsample of isolates was selected and used for 16S ribosomal DNA PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, *nifH* copy number determination, and host range experiments. Plasmid profiles and *nifH* hybridization patterns also revealed the occurrence of lateral plasmid transfer among distinct multilocus genotypes within species but not between species. Both species were recovered from nodules of the same plants, indicating that mechanisms other than host, spatial, or temporal isolation may account for the genetic barrier between the species. The biogeographic implications of finding an *R. gallicum* bv. gallicum population nodulating common bean in America are discussed.

Rhizobia are soil bacteria that are capable of inducing the formation of nitrogen-fixing nodules on the roots or stems of particular legume host plants (51). Rhizobial species seem to have coevolved with their hosts at their centers of diversification (30). Common bean (*Phaseolus vulgaris*) originated in America; this plant was exported to the rest of the world starting in the early 16th century, and it is currently an important crop worldwide (17, 18). At least five species have been reported to nodulate common bean. *Rhizobium etli* bv. phaseoli is the predominant *P. vulgaris*-nodulating species in Mexico, Colombia, and Argentina (1, 11, 42). *R. etli* bv. phaseoli is found in regions where common bean has been introduced, such as Spain, France, Austria, Senegal, Gambia, and Tunisia (10, 21, 24, 33, 34, 44). However, in these countries other *Rhizobium* species also nodulate this legume. *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli is commonly found in Europe, and it has also been reported to be present in Tunisia and Colombia (11, 21, 33, 34). *Rhizobium tropici* is present in acid soils of South America (31) and has been found in France (2) and several African countries (4, 10). *Rhizobium giardinii* has been found only in European and Tunisian soils (3, 21, 34). *Rhizo-*

*bium gallicum* has been found nodulating beans in Europe (3, 21) and Tunisia (33, 34), and one Mexican strain (strain FL27) has been identified as a member of this species (44).

In *Rhizobium* a large proportion of the genome is composed of plasmids (16), which contribute significantly to the ecological fitness and symbiotic performance of rhizobial strains (6, 8, 16). The symbiotic genes for nodulation (*nod*) and nitrogen fixation (*nif*, *fix*) are located on the symbiotic plasmid (pSym). The pSym plasmids of biovar phaseoli strains that nodulate *P. vulgaris* have multiple copies of the nitrogenase reductase gene (*nifH*) and confer a restricted host range (28). In contrast, *R. tropici* and *R. gallicum* bv. gallicum pSym plasmids carry a single *nifH* copy and confer a broader host range that includes *Leucaena* spp. (3, 9). Segovia and collaborators (41) suggested that *R. leguminosarum* bv. phaseoli is the result of pSym transfer from *R. etli* bv. phaseoli in historic times. The *R. gallicum* and *R. giardinii* bv. phaseoli strains that nodulate *P. vulgaris* harbor pSym plasmids similar to those found in *R. leguminosarum* bv. phaseoli and *R. etli* bv. phaseoli, which led Amarger and colleagues (3) to propose that the acquisition of *R. etli* bv. phaseoli pSym took place via *R. leguminosarum* strains. The presence of viable *R. etli* bv. phaseoli strains on the testa of *P. vulgaris* seeds has been demonstrated (36). This finding could explain the geographical spread of *R. etli* bv. phaseoli and provides a scenario for the lateral transfer of pSym among indigenous *Rhizobium* species in historic and recent times along with the introduction of bean crops worldwide.

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México D. F. 04510, Mexico. Phone: (52) 55 56229006. Fax: (52) 55 56228995. E-mail: csilva@miranda.ecologia.unam.mx.

Besides the strong evidence for interspecies *pSym* transfer, population level analyses of *Rhizobium* species have also revealed the existence of lateral transfer of *pSym* within species in agricultural fields and pastures (25, 27, 40, 60). However, Wernegreen and colleagues (57) found a limited pattern of *pSym* transfer (48) in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* populations associated with native *Trifolium* species growing in mountain meadows of California.

The effects of agricultural practices and plant host domestication on the genetic structure of *Rhizobium* populations have scarcely been addressed (30, 47). The domestication of wild *P. vulgaris* plants began around 4,000 years ago in Mesoamerica and the Andean region of South America (22). Beans were probably codomesticated with maize in Mesoamerica, since these two crops are grown in association in a traditional agro-system called milpa (29). The milpa system is a prehispanic cultivation method, in which beans are intercropped with maize and squash, together with diverse other plant species that are locally used for medicinal and nutritional purposes (47). This cultural practice promotes bean nitrogen fixation, and its advantages have been recognized (5, 29). In a previous study we compared the genetic structures of *R. etli* bv. phaseoli strains associated with beans under different degrees of domestication (47). We found that the bacteria associated with milpa beans had a genetic structure intermediate between the genetic structures of the bacteria isolated from wild beans and monocultured beans (47). In a more recent study, we analyzed the genetic structure of a *Rhizobium* population obtained from nodules of *P. vulgaris* and *Phaseolus coccineus* plants from milpa plots in San Miguel, Puebla, Mexico, with the aim of understanding its spatial variation (45). To do this, six plots were sampled in a single year, and a hierarchical analysis of multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) data revealed (i) the coexistence of two distantly related genetic groups, designated genetic divisions I and III, and (ii) the existence of numerically dominant genotypes within each division; in addition, linkage disequilibrium analyses indicated that recombination is frequent within each genetic division but not between the divisions, which led us to propose a reticulated and epidemic genetic structure (32, 45). In the present study, *P. vulgaris* plants from one of the previously studied milpa plots were sampled over three consecutive years to determine (i) the temporal stability of the population genetic structure, (ii) the structure and dynamics of the plasmidic compartment, and (iii) the taxonomic affiliations of the genetic groups identified.

#### MATERIALS AND METHODS

**Description of the sampling site and procedure.** San Miguel Acuexcomac is a village with a semiarid climate (annual rainfall, 600 mm) and an alkaline soil (pH 8.4) and is located in the state of Puebla, Mexico (45). This area has a long history of bean cultivation that extends for centuries and has never been inoculated with rhizobial strains (47). Agricultural plots are traditionally managed as typical milpas, in which bean, maize, and squash are cultivated together. Low levels of fertilizer, minimal tillage, and hand weeding practices are used. The main *P. vulgaris* variety grown at this site is the climbing landrace called mantequilla. The germplasm is actively maintained by the indigenous community, and each year seeds from the previous crop are sown (47). One plot (plot B of Silva et al. [45]) was sampled in three consecutive years (1994, 1995, and 1996). *Rhizobium* isolates were obtained in the field from root nodules of *P. vulgaris* plants. One isolate was obtained from each nodule, as previously described (45). All isolates were tested for growth on plates coated with PY medium (per liter, 5 g of peptone, 3 g of yeast extract, and 1 g of calcium chloride) supplemented

with nalidixic acid (60 µg/ml) and on Luria-Bertani plates. Isolates were deposited in the collection of the Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

**MLEE.** Cell lysates of the isolates were obtained as previously described (45), and electrophoresis was performed on cellulose acetate membranes (20, 45). The following six enzymes were assessed: isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42), peptidase (EC 3.4.13), phosphoglucosyltransferase (EC 5.4.2.2), glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49), xanthine dehydrogenase (EC 1.1.1.204), and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37). Isocitrate dehydrogenase, peptidase, and phosphoglucosyltransferase each exhibited one band of activity, glucose-6-phosphate dehydrogenase and xanthine dehydrogenase each exhibited two bands, and malate dehydrogenase exhibited three bands, which yielded a total of 10 loci for analysis.

**Genetic diversity and cluster analysis.** Distinctive mobility variants of each enzyme, numbered in order of decreasing anodal mobility, were considered alleles at the corresponding locus (43). In the case of enzymes that produced more than one band, each band was considered a locus. The absence of enzyme activity was scored as a null allele and was treated as an ordinary allele. The combined allele profiles were defined as multilocus genotypes (electrophoretic types [ETs]). Based on allele frequencies for ETs, the genetic diversity for an enzyme locus ( $h$ ) was calculated as follows:  $h = (1 - \sum x_i^2)/n(n-1)$ , where  $x_i$  is the frequency of the  $i$ th allele and  $n$  is the number of ETs (43). The total mean genetic diversity ( $H$ ) is the arithmetic mean of  $h$  values for all loci and represents the proportion of loci at which two randomly chosen genotypes can be expected to differ. To compute the  $H$  values, we used the program ETDIV, version 2.2 (58).

The genetic distance between each pair of different ETs was estimated by determining the mean character differences, and a similarity matrix was constructed by using the PAUP\* program (53); the data were clustered by the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) (46).

**Genetic differentiation.** To estimate the relative genetic differentiation ( $G_{st}$ ), we used Nei's equation,  $G_{st} = (H_t - H_s)/H_t$  (49), where  $H_t$  is the expected diversity in an equivalent randomly mating total population and  $H_s$  is the average diversity of the subpopulations. To compute the  $G_{st}$  values, we used the program ETDIV, version 2.2 (58). The indices range from 0, if there is no genetic differentiation at a given level, to 1, if there is maximal genetic differentiation (35). To test if the  $G_{st}$  values were significantly different from 0, we performed a chi-square test of independence as follows:  $\chi^2 = nG_{st}(a-1)$ , where  $n$  is the number of individuals and  $a$  is the total number of alleles. The degrees of freedom are  $(k-1)(a-1)$ , where  $k$  is the number of subdivisions. The degrees of freedom and  $\chi^2$  values were summed across loci, and significance was examined at a  $P$  value of  $<0.05$  (19, 59).

**Linkage disequilibrium analyses.** To determine the extent to which populations exhibited nonrandom associations of alleles between loci, we used a multilocus index based on the distribution of allelic mismatches between pairs of isolates for all loci. The ratio of the variance in mismatches observed in a population ( $V_o$ ) to the expected variance of the corresponding population at linkage equilibrium (random association of alleles) ( $V_e$ ) provides a measure of linkage disequilibrium. If there is no linkage disequilibrium,  $V_o/V_e$  is 1. The significance of the difference between  $V_o$  and  $V_e$  was calculated by using a Monte Carlo procedure with 1,000 iterations, which was carried out with the LDV program (50).

**Visualization and cluster analysis of plasmid profiles.** The plasmid contents of the isolates were visualized by using the Eckhardt procedure (12). Plasmid mobilities were determined in 0.7% agarose gels by using plasmids of *R. etli* bv. phaseoli CFN42 and *Sinorhizobium meliloti* 1021 as molecular size references. A plasmid profile similarity matrix was constructed by using the PAUP\* program (53), and data were clustered by using the UPGMA algorithm (46).

**PFGE of plasmids and *pSym* determination.** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to obtain accurate size estimates for plasmids from selected isolates and to identify the *pSym* plasmids. Intact genomic DNA was prepared in 0.8% agarose plugs and subjected to PFGE in a contour-clamped homogeneous electric field apparatus (CHEF-DRII; Bio-Rad) by following the manufacturer's instructions. Electrophoresis was carried out at 13°C with a constant voltage of 4.5 V cm<sup>-1</sup> by using a two-block program as follows: block 1, 30-s initial switch, 60-s final switch, and 8-h run time; and block 2, 50-s initial switch, 100-s final switch, and 28-h run time. *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes (Bio-Rad) were used as molecular size markers. Gels were stained with ethidium bromide, photographed, and transferred to nylon filters. Membrane hybridization with a *nifH* probe was performed as described below.

**Analysis of *nifH* gene organization.** Genomic DNA from 34 isolates was digested with endonuclease *Bam*HI, subjected to 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, photographed, and transferred to nylon filters.

An internal *nifH* fragment (~450 bp) from strain CFN42 was amplified with primers o1 and o3 (37), as described below. This fragment was labeled with digoxigenin-dUTP by using random primers, and detection was performed with anti-digoxigenin-alkaline phosphatase Fab fragments by using the chemiluminescence system and following the instructions of the manufacturer (Roche). Membrane hybridization and washing were performed under high-stringency conditions (65°C, 0.5× SSC [1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 sodium citrate]). Some membranes were also hybridized with a lambda probe to obtain accurate estimates of the hybridization signal sizes on gels normalized with *Hind*III-digested lambda DNA.

**Plant nodulation tests and acetylene reduction assay.** Seeds of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* cv. Peruvian were surface sterilized with sodium hypochlorite (54). Pregerminated seeds were placed in flasks filled with vermiculite, watered with an N-free plant nutrient solution (13), and inoculated with each of the 34 selected isolates. Plants were maintained in a growth chamber at 28°C with a photoperiod of 15 h. After 4 weeks, the numbers of nodules were counted, and nitrogen fixation was measured by the acetylene reduction assay (54).

**PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the 16S rRNA gene.** The 16S rRNA genes of 34 isolates were PCR amplified by using primers rD1 and rD1 (55). The amplification products were digested with endonucleases *Sau*3AI, *Msp*I, and *Pst*I and visualized in agarose gels as described elsewhere (23). Type and reference strains of the five recognized species that nodulate common bean (*R. etli* bv. phaseoli CFN42, *R. tropici* CIAT899 and CFN299, *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA2671, *R. gallicum* bv. gallicum R602sp and FL27, and *R. giardinii* H152) were included for comparison.

**PCR amplification and nucleotide sequencing.** Two isolates were selected for partial DNA sequencing of two chromosomal genes, *rrs* coding for 16S rRNA and *glnII* coding for glutamine synthetase, and two pSym genes, *nifH* and *nodB*, coding for the dinitrogenase reductase and N-acetylglucosamine deacetylase, respectively. For PCR amplification, a reaction mixture (50 µl) containing 1× PCR buffer (Gibco BRL), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, each deoxynucleotide triphosphate at a concentration of 200 µM, each primer at a concentration of 0.2 µM, and 2 U of *Taq* polymerase was used. The following temperature profile was used for all amplifications: 3 min at 94°C, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at the appropriate annealing temperature, and 1 min of extension at 72°C and a final extension cycle consisting of 72°C for 5 min. The annealing temperatures for the different primer pairs are indicated below. *rrs* gene fragments were amplified with primers PF2 (TACTGTGATCTGGAGTATG) and PR1 (ATTGTAGC ACGTGTGTAGCC) (annealing temperature, 60°C); *glnII* gene fragments were amplified with primers GSF1B and GSR2seq (56) (annealing temperature, 70°C); *nifH* sequences were amplified with primers o1 and o3 (37) (annealing temperature, 58°C); and almost complete *nodB* genes were amplified with primers nodB3F (56) and nodCRR (GAGACGGCGRCRRTGCTGGTTG) (annealing temperature, 65°C). The same primers were used for sequencing reactions with ABI Prism Big Dye chemistry, and the products were analyzed with an ABI377 sequencer (ABI, Foster City, Calif.).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The sequences obtained in this study have been deposited in the GenBank sequence database under accession numbers AF529011 to AF529022.

## RESULTS

**Plant sampling and bacterial isolation.** In 1994, 1995, and 1996 six, seven, and eight plants were sampled and 30, 38, and 58 isolates were obtained, respectively (Table 1). Over the 3 years a total of 21 plants were sampled and 126 isolates were obtained. All isolates grew on PY plates supplemented with nalidixic acid (60 µg/ml) but were unable to grow on Luria-Bertani plates. A total of 108 isolates formed gummy colonies on PY plates (classified as *R. etli* [see below]), and the remaining 18 isolates exhibited a rough colony appearance (classified as *R. gallicum* [see below]). Ten of the 21 plants sampled harbored *R. etli* isolates exclusively, whereas 11 plants harbored both *R. etli* and *R. gallicum* isolates.

**Genetic diversity, genetic differentiation, and cluster analysis.** The MLEE survey yielded 43 different multilocus genotypes for the 126 isolates. Cluster analysis of the MLEE data revealed two genetic divisions separated at a mean genetic

distance of 0.7 (Fig. 1), corresponding to genetic divisions I and III described previously (45). On the basis of the nucleotide sequence, plasmid profiling, *nifH* copy number, and host range analyses described below, the 18 division I isolates were classified as *R. gallicum* bv. gallicum, and the 108 division III isolates were confirmed to be *R. etli* bv. phaseoli. The *R. gallicum* and *R. etli* isolates had similar mean genetic diversities (Table 2), and both populations displayed ET dominance, since a few ETs were represented by many isolates (Table 1 and Fig. 1). For the *R. gallicum* population, ET4 was recovered at the highest frequency and ET4 isolates comprised 33% of the *R. gallicum* isolates, although it was not found in the 1996 samples (Table 1). In the *R. etli* population, ET1, ET2, and ET3 (with 38, 18, and 15 isolates, respectively) were the most abundant ETs, were found in all 3 years and comprised 66% of the *R. etli* isolates (Table 1 and Fig. 1). A chi-square test showed that the frequencies of these three ETs did not vary significantly over the 3 years ( $\chi^2 = 7.14$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0.129$ ), suggesting that there was temporally stable genotype dominance in the population. These dominant *R. etli* genotypes grouped in a tight cluster, as shown in Fig. 1 (mean genetic distance, <0.2), indicating that they form a clonal complex (14).

The level of genetic differentiation between the *R. etli* and *R. gallicum* populations was high and significant ( $G_{st} = 0.285$ ;  $P < 0.001$ ), whereas the levels of intrapopulation genetic differentiation over the 3 years for *R. etli* ( $G_{st} = 0.073$ ;  $P = 0.243$ ) and *R. gallicum* ( $G_{st} = 0.045$ ;  $P = 0.999$ ) were not significant (Table 2). Furthermore, of the 37 alleles found in the 126 isolates, 8 were detected exclusively in the *R. gallicum* population, while 12 were unique to the *R. etli* population, and the 17 shared alleles were found at disparate frequencies in the two species (the MLEE data set is available from the corresponding author upon request). These results indicate that the two species do not share the main part of their alleles and that within the species the levels of genetic variability remained constant during the 3 years sampled.

**Linkage disequilibrium analyses.** A hierarchical linkage disequilibrium analysis was performed with the MLEE data set to estimate the extents of genetic exchange within and between the *R. etli* and *R. gallicum* populations. As shown in Table 2, both populations showed linkage equilibrium when only ETs were included in the analysis. When all isolates of each species were considered, the populations appeared to be in linkage disequilibrium, due to the presence of numerically dominant ETs (epidemic clones [32]). These results revealed an epidemic genetic structure for both species, in which the frequency of a few dominant genotypes increases to produce epidemic clones, but frequent genetic exchange occurs among the members of the population. Linkage disequilibrium was detected when the analysis was performed with either all 126 isolates or 43 ETs (Table 2), indicating that the extent of genetic exchange between *R. etli* and *R. gallicum* is negligible, if there is any exchange at all.

**Diversity and cluster analysis of plasmid profiles.** Eleven plasmid size classes were identified among the 18 *R. gallicum* isolates; the sizes ranged from ~50 to >1,500 kb and represented seven distinct profiles (Table 1 and Fig. 1). *R. gallicum* isolates harbored two to four plasmids (average, 3.1 plasmids), and all isolates contained a >1,500-kb megaplasmid, which was

TABLE 1. Distribution of ETs and plasmid profiles among 18 *R. gallicum* and 108 *R. etli* isolates from nodules of *P. vulgaris* plants over three consecutive years<sup>a</sup>

ET	Sampling year			Total no. of isolates
	1994	1995	1996	
<i>R. gallicum</i>				
ET4	<b>P13</b> (2) <sup>b</sup>	<b>P12</b> (2), <b>P21</b> , <b>P22</b>		6
ET8			<b>P4</b> , <b>P31</b>	2
ET12	<b>P4</b>			1
ET15		<b>P4</b>		1
ET16		<b>P12</b>		1
ET19		<b>P14</b>		1
ET26		<b>P4</b>		1
ET29			<b>P4</b>	1
ET30			<b>P4</b>	1
ET38			<b>P4</b>	1
ET39			<b>P14</b>	1
ET40			<b>P4</b>	1
<i>R. etli</i>				
ET1	<b>P1</b> (2), <b>P2</b> (5), <b>P5</b> (2), <b>P6</b> , <b>P11</b> , <b>P19</b>	<b>P1</b> (4), <b>P2</b>	<b>P1</b> (9), <b>P2</b> (2), <b>P3</b> , <b>P5</b> (2), <b>P6</b> (3), <b>P8</b> , <b>P11</b> , <b>P26</b> , <b>P27</b>	38
ET2	<b>P3</b> , <b>P9</b> , <b>P10</b> , <b>P17</b> , <b>P18</b> , <b>P20</b>	<b>P1</b> , <b>P3</b> (2), <b>P7</b> , <b>P9</b> , <b>P10</b> , <b>P23</b>	<b>P1</b> , <b>P16</b> , <b>P25</b> , <b>P29</b> , <b>P32</b>	18
ET3	<b>P2</b> (4), <b>P3</b> (3)	<b>P3</b> (3)	<b>P1</b> , <b>P2</b> (2), <b>P3</b> , <b>P15</b>	15
ET5	<b>P9</b>		<b>P9</b> , <b>P10</b>	3
ET6			<b>P1</b> (3)	3
ET7		<b>P1</b> (2), <b>P2</b>		3
ET9			<b>P1</b> , <b>P30</b>	2
ET10			<b>P1</b> , <b>P8</b>	2
ET11	<b>P2</b>	<b>P3</b>		2
ET13		<b>P3</b>		1
ET14		<b>P11</b>		1
ET17		<b>P2</b>		1
ET18		<b>P7</b>		1
ET20		<b>P3</b>		1
ET21		<b>P5</b>		1
ET22		<b>P16</b>		1
ET23		<b>P15</b>		1
ET24		<b>P7</b>		1
ET25		<b>P7</b>		1
ET27		<b>P24</b>		1
ET28			<b>P1</b>	1
ET31			<b>P3</b>	1
ET32			<b>P5</b>	1
ET33			<b>P28</b>	1
ET34			<b>P2</b>	1
ET35			<b>P8</b>	1
ET36			<b>P1</b>	1
ET37			<b>P3</b>	1
ET41			<b>P1</b>	1
ET42			<b>P8</b>	1
ET43			<b>P33</b>	1

<sup>a</sup> A total of 126 isolates were obtained (30 isolates in 1994, 38 isolates in 1995, and 58 isolates in 1996).

<sup>b</sup> Plasmid profiles found in multiple isolates are indicated by boldface type, and the number of isolates is given in parentheses when there was more than one isolate.

absent in the *R. etli* population (Table 3). Profile P4 was the dominant profile; it was observed in 44% of the isolates (Table 1 and Fig. 1) and was indistinguishable from the profile of the type strain of *R. gallicum* bv. *gallicum* R602sp (Table 3). Fifteen plasmid size classes were detected among the population of 108 *R. etli* isolates, and the plasmid sizes ranged from ~125 to ~700 kb. Twenty-six plasmid profiles were found, consisting of two to five plasmids (average, 3.5 plasmids). All of the *R. etli* profiles included the ~700-kb plasmid, which was not found in the *R. gallicum* population (Table 3). The *R. etli* population displayed a high degree of plasmid profile dominance, with many isolates sharing a few plasmid profiles. Profiles P1, P2, and P3 were found in 57% of the *R. etli* isolates (Table 1 and

Fig. 1); these profiles were the predominant profiles and were recovered in all 3 years. A chi-square test indicated that the frequencies of these three profiles varied significantly over the 3 years ( $\chi^2 = 19.32$ ;  $df = 4$ ;  $P < 0.001$ ). Profile P1 was the most abundant profile in 1996, P2 was the most abundant profile in 1994, and P3 was the most abundant profile in 1995. These apparent temporal changes in plasmid profile dominance in the *R. etli* population could have been due simply to the small sample size or could reflect actual changes in the plasmid combinations selected in the crop seasons (for example, due to fluctuations in environmental conditions).

Figure 1 shows the separation of *R. gallicum* and *R. etli* populations on the basis of both MLEE and plasmid profiles.

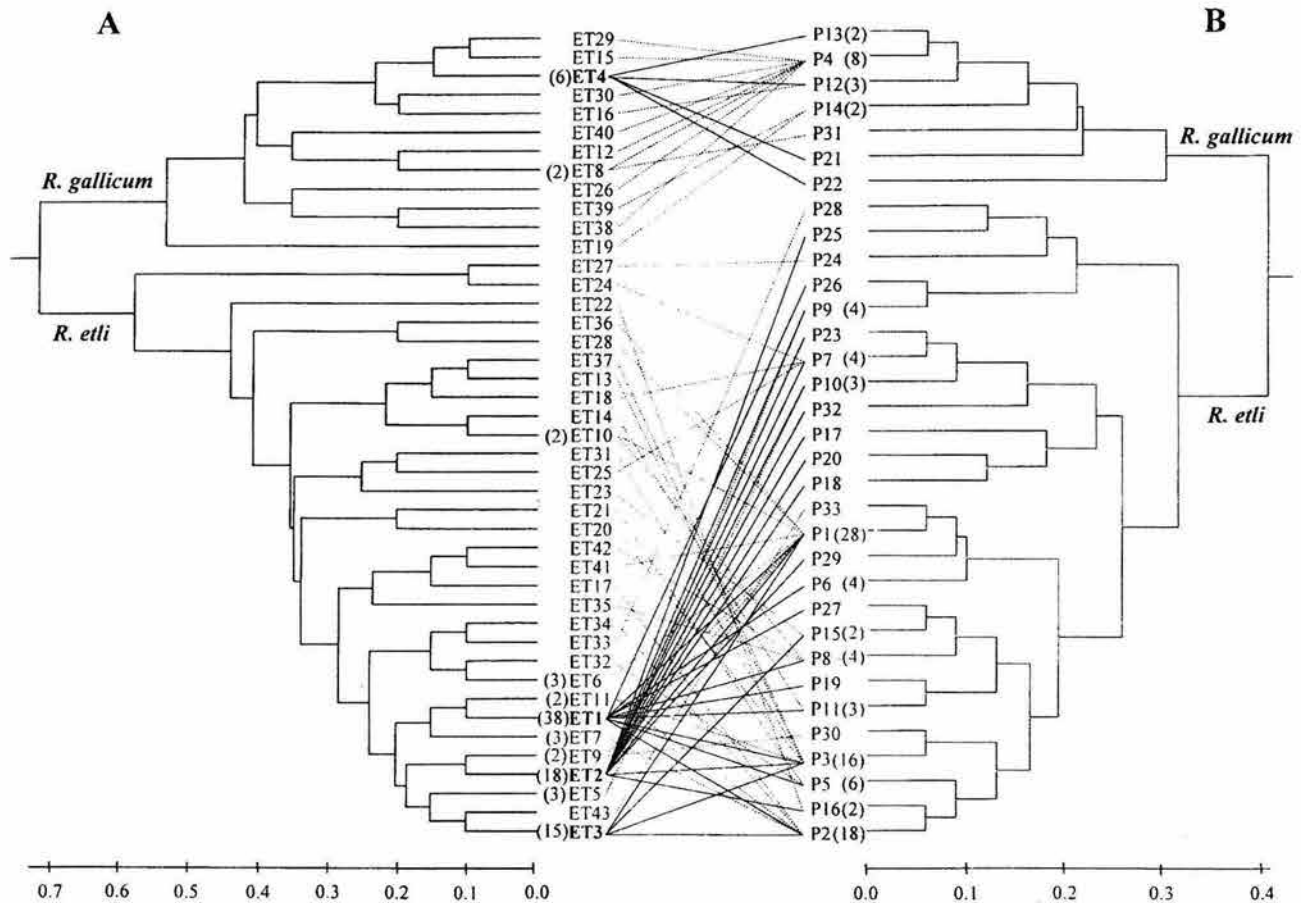


FIG. 1. Dendrograms showing the genetic relatedness among chromosomal and plasmidic genotypes of *R. etli* and *R. gallicum* and the chromosome-plasmid profile combinations. (A) Genetic relatedness of the multilocus genotypes based on 10 isoenzymatic loci. The ET designations are indicated. (B) Genetic relatedness of the plasmid profiles based on the presence or absence of the different plasmid size classes. The plasmid profile designations are indicated. The number of isolates for each multiple ET or plasmid profile is given in parentheses. The genetic distance between each pair of ETs or plasmid profiles was estimated by determining mean character differences, and data were clustered by the UPGMA. The four most abundant ETs and their plasmid profile combinations are indicated by boldface type and solid lines; the other combinations are indicated by dashed lines.

It is noteworthy that within species isolates belonging to the same ET could have different plasmid profiles and, conversely, that a particular plasmid profile could be found in isolates with different ETs, suggesting that plasmid transfer occurs within conspecific populations but not between species, as graphically shown in Fig. 1.

Based on the MLEE and plasmid profile data, 34 isolates were selected for further molecular analyses; this selection included 10 isolates from the *R. gallicum* population and 24 isolates from the *R. etli* population. This selection included isolates from dominant ETs and plasmid profiles, as well as isolates displaying unique ETs or plasmid profiles (Table 3).

TABLE 2. Genetic diversity, genetic differentiation, and linkage disequilibrium estimates for *R. gallicum* and *R. etli* populations associated with *P. vulgaris* plants in San Miguel Acuecomac, Mexico

Population	No. of isolates	No. of ETs	Mean genetic diversity	Mean no. of alleles	$G_{st}$	Isolates			ETs		
						Mean no. of mismatches	$V_o/V_e^a$	$P^b$	Mean no. of mismatches	$V_o/V_e^a$	$P^b$
<i>R. gallicum</i>	18	12	0.388 (0.086) <sup>c</sup>	2.5	0.045	3.3	1.66	<0.001	3.9	0.96	NS <sup>d</sup>
<i>R. etli</i>	108	31	0.351 (0.059)	2.9	0.073	1.9	1.72	<0.001	3.5	1.06	NS
Total	126	43	0.501 (0.060)	3.7	0.285 <sup>e</sup>	3.3	3.90	<0.001	5.0	2.18	<0.001

<sup>a</sup> Observed variance/expected variance of the mismatch distribution.

<sup>b</sup> Probability of rejecting by chance the null hypothesis that  $V_o = V_e$ .

<sup>c</sup> The values in parentheses are standard errors.

<sup>d</sup> NS, not significant.

<sup>e</sup>  $G_{st}$  is significantly different from 0.

TABLE 3. Multilocus genotypes (ETs), plasmid profiles, 16S ribosomal DNA RFLP patterns, *nifH* hybridization patterns, and estimated sizes of plasmids and *nifH* hybridization bands for 34 selected *P. vulgaris* isolates and reference strains

Strain <sup>a</sup>	ET	16S ribosomal DNA RFLP pattern <sup>b</sup>	Plasmid		<i>nifH</i>	
			Profile	Sizes (kb) <sup>c</sup>	Pattern	Size(s) (kb)
<i>R. gallicum</i> isolates						
IE992	ET4	AAB	P13	>1,500, <b>550</b> , 350, 250	C1	8.3
IE2703	ET4	AAB	P22	>1,500, 650, 125, 50	C1	8.3
IE4868	ET40	ABA	P4	>1,500, <b>550</b> , 250	C1	8.3
IE4845	ET38	AAA	P4	>1,500, 550, 250	C1	8.3
IE2729	ET15	AAB	P4	>1,500, 550, 250	C2	9.5
<u>IE988</u>	ET12	AAA	P4	>1,500, 550, 250	C2	9.5
IE4770	ET29	AAB	P4	>1,500, 550, 250	C1	8.3
IE4872	ET8	AAA	P31	>1,500, <b>550</b> , 180, 125	C1	8.3
IE2735	ET16	ABA	P12	>1,500, 550	C1	8.3
IE2751	ET19	ABA	P14	>1,500, <b>525</b> , 250	C3	12.0
<i>R. etli</i> isolates						
IE4810	ET6	BAB	P1	700, 550, 450	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE4813	ET32	BAB	P5	700, 450, <b>390</b> , 125	B1	5.6, 9.8
IE4794	ET31	BAB	P3	700, 450, <b>390</b> , 250	A2	2.6, 12.4, 16.6
IE4803	ET5	BAB	P9	700, <b>500</b> , 425	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE4815	ET33	BAB	P28	700, <b>425</b> , 350, 270	A2	2.6, 12.4, 16.6
IE4876	ET43	BAB	P33	700, 550, 450, 225	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE954	ET1	BAB	P1	700, <b>550</b> , 450	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE4777	ET1	BAB	P1	700, 550, 450	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE963	ET1	BAB	P2	700, 450, <b>390</b>	B1	5.6, 9.8
<u>IE2730</u>	ET1	BAB	P2	700, 450, 390	B1	5.6, 9.8
IE4804	ET1	BAB	P3	700, <b>490</b> , <b>390</b> , 250	A2	2.6, 12.4, 16.6
IE4877	ET1	BAB	P5	700, 450, 390, 125	B1	5.6, 9.8
IE994	ET1	BAB	P5	700, 450, 390, 125	B1	5.6, 9.8
IE1006	ET1	BAB	P6	700, <b>550</b> , 450, 125	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE1009	ET1	BAB	P11	700, <b>450</b>	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE2737	ET2	BAB	P1	700, <b>550</b> , 450	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE4795	ET2	BAB	P1	700, 550, 450	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE950	ET2	BAB	P3	700, 450, <b>390</b> , 250	A2	2.6, 12.4, 16.6
IE2704	ET2	BAB	P3	700, 450, <b>390</b> , 250	A2	2.6, 12.4, 16.6
IE1004	ET2	BAB	P10	700, 450, <b>350</b> , 300, 250	A2	2.6, 12.4, 16.6
IE4874	ET3	BAB	P1	700, 550, <b>450</b>	A1	4.6, 12.4, 16.6
IE951	ET3	BAB	P2	700, 450, <b>390</b>	B2	4, 5.6, 9.8
IE4837	ET3	BAB	P2	700, 450, 390	B2	4, 5.6, 9.8
IE4771	ET3	BAB	P3	700, 450, <b>390</b> , 250	B1	5.6, 9.8
Reference strains						
CFN42	ET44	BAB	P34	650, 510, <b>390</b> , 270, 180, 150	B2	4, 5.6, 9.8
FL27	ND <sup>d</sup>	AAB	P35	>1,500, 600, 390	C1	8.3
R602sp	ND	AAA	P4	>1,500, 550, 250	C1	8.3

<sup>a</sup> The underlined isolates were used for determination of *rrs*, *ghnII*, *nifH*, and *nodB* gene sequences.

<sup>b</sup> Each letter refers to a restriction pattern obtained with the enzymes *Sau3AI*, *MspI*, and *PstI*. Restriction sites for each enzyme were mapped on the *rrs* sequence of *R. gallicum* R602sp (accession number U86343), which had an AAA pattern. The type B pattern for *Sau3AI* contained additional restriction sites at nucleotides 501, 505, and 561. The *MspI* type B pattern lacked the site at position 951. For *PstI* digestion, the type B pattern had an additional restriction site at nucleotide 926.

<sup>c</sup> *pSym* plasmids are indicated by boldface type.

<sup>d</sup> ND, not determined.

**PFGE and *pSym* identification.** PFGE was used to obtain accurate plasmid size estimates for the 34 isolates selected for molecular analyses, and the values are shown in Table 3. These values were used to estimate the plasmid sizes for the whole sample of 126 isolates, based on Eckhardt plasmid profiles.

The *pSym* plasmids of 20 isolates (4 *R. gallicum* and 16 *R. etli* isolates) were identified by Southern analysis of plasmid profiles resolved by PFGE by using a *nifH* probe and are indicated in Table 3. Most *R. gallicum* isolates harbored 550-kb *pSym* plasmids; the single exception was isolate IE2751, which harbored a 525-kb *pSym*. The sizes of the *pSym* plasmids of *R. etli* isolates ranged from 350 to 550 kb. One-half of the *R. etli* isolates contained a 390-kb *pSym*, like the *R. etli* type strain CFN42. In general, *pSym* plasmids of the same size were associated with identical or similar plasmid profiles; for example,

isolates with profiles P2 and P3 harbored 390-kb *pSym* plasmids. The only exception was isolate IE4874, which contained a 450-kb *pSym*, whereas the other two isolates with profile P1 contained 550-kb *pSym* plasmids (Table 3).

**Determination of *nifH* copy number by Southern hybridization.** For the 34 isolates analyzed, six different hybridization patterns were recorded (Table 3). All *R. gallicum* isolates exhibited a single hybridization signal, and most of them shared an ~8.3-kb hybridizing band (pattern C1) with *R. gallicum* bv. *gallicum* strains R602sp and FL27 (Table 3), supporting classification of our isolates as members of *R. gallicum* bv. *gallicum*. All *R. etli* isolates contained multiple (two or three) *nifH* copies, and two groups of related patterns were observed. Patterns A1 and A2 had two bands with sizes of ~12.4 and ~16.6 kb, while patterns B1 and B2 had two bands with sizes

TABLE 4. Average numbers of nodules formed by 10 *R. gallicum* and 24 *R. etli* isolates on three leguminous hosts<sup>a</sup>

Organism	No. of nodules formed on:		
	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. atropurpureum</i>	<i>L. leucocephala</i>
<i>R. gallicum</i>	12.6 ± 3.1 (F) <sup>b</sup>	15.1 ± 1.2 (F)	5.3 ± 1.1 (F)
<i>R. etli</i>	36.6 ± 3.4 (F)	4.5 ± 0.75	0.0

<sup>a</sup> See Table 3.<sup>b</sup> Average ± standard error. (F), nitrogen fixation (acetylene reduction was detected in nodules).

of ~5.6 and ~9.8 kb; the latter pattern was identical to that displayed by type strain *R. etli* CFN42 (Table 3).

Within the *R. gallicum* and *R. etli* populations, *nifH* hybridization patterns could be found scattered throughout the different branches of the MLEE and plasmid profile dendrograms, further supporting the conclusion derived from the comparative cluster analyses of MLEE and plasmid profile data that lateral transfer of plasmids occurs within each species but not between the species. However, in some instances an association between plasmid profile and *nifH* pattern within species was observed. For example, all the *R. etli* isolates that had a P1 plasmid profile displayed a type A1 *nifH* hybridization pattern, as summarized in Table 3. Notable associations between pSym size and *nifH* hybridization pattern were also found. For example, *R. etli* isolates with the A1 *nifH* pattern harbored 450- to 550-kb pSym plasmids, the A2 *nifH* patterns were associated with 390- to 425-kb pSym plasmids, and the B1 and B2 *nifH* patterns were strictly associated with 390-kb pSym plasmids (Table 3). *R. gallicum* isolates with 550-kb pSym plasmids yielded only the C1 *nifH* pattern, while a 525-kb pSym was associated with the distinct C3 *nifH* pattern. A 550-kb pSym was detected in the *R. etli* and *R. gallicum* populations, but the *nifH* hybridization patterns revealed that these plasmids were distinct.

**Plant nodulation tests and symbiotic effectiveness.** All 34 selected isolates (Table 3) nodulated and fixed nitrogen with *P. vulgaris* plants (Table 4). However, *R. gallicum* isolates induced only one-third of the nodules induced by *R. etli* isolates. All *R. gallicum* isolates formed effective nodules on *M. atropurpureum*, whereas *R. etli* isolates induced less than one-third of the nodules induced by *R. gallicum* isolates on this host and were ineffective (Table 4). All *R. gallicum* isolates nodulated and fixed nitrogen on *L. leucocephala* plants, further supporting classification of these isolates as *R. gallicum* bv. *gallicum*, while all *R. etli* isolates were unable to nodulate this host (Table 4).

**PCR-RFLP analysis of the 16S rRNA gene.** Almost complete 16S rRNA genes (~1.5 kb) for 34 isolates were PCR amplified and digested with endonucleases *Sau3AI*, *MspI*, and *PstI*. Four different composite restriction patterns were found (Table 3). *R. gallicum* isolates displayed three different patterns (AAA, AAB, and ABA); pattern AAB was identical to the pattern of *R. gallicum* FL27, while pattern AAA was identical to the pattern of *R. gallicum* R602sp. All *R. etli* isolates displayed the same restriction pattern (BAB), which was identical to the pattern of *R. etli* CFN42 (Table 3). The restriction sites for each enzyme were mapped on the *rrs* sequence of *R. gallicum* R602sp (accession number U86343) and are indicated in Table 3. The patterns displayed by other *Rhizobium* refer-

ence species were different from those of our isolates (data not shown).

**Nucleotide sequence analyses.** Partial sequences of two chromosomally encoded genes (*rrs* and *glnII*) and two pSym-encoded genes (*nifH* and *nodB*) were determined for *R. gallicum* isolate IE988 (ET12 in Table 1 and Fig. 1) and *R. etli* isolate IE2730 (ET1 in Table 1 and Fig. 1) and, when the sequences were not available in public sequence databases, also for *R. gallicum* strains R602sp and FL27.

The 558-bp *rrs* sequence segment of isolate IE988 was very similar to that of strain R602sp (Table 5). However, the level of similarity with the R602sp and FL27 sequences reported by Sessitsch et al. (44) was lower, due to the presence of several insertions which are absent in the R602sp sequence reported by Amarger et al. (3) and in our IE988 sequence. The *rrs* sequence of isolate IE2730 differed only at two nucleotides from the *rrs* sequence of *R. etli* CFN42 (Table 5).

A 540-bp *glnII* sequence segment was obtained for isolates IE988 and IE2730 and for strains R602sp and FL27. The highest levels of similarity were found between isolate IE988 and strains FL27 and R602sp, while isolate IE2730 showed the highest level of similarity with *R. etli* CFN42 (Table 5).

The 389-bp *nifH* sequence segment obtained for isolate IE988 was most similar to the *nifH* sequence segments of strains R602sp and FL27, while the *nifH* sequence of isolate IE2730 was identical to the sequence of the three paralogous *nifH* copies of *R. etli* CFN42 (Table 5).

An almost complete *nodB* sequence segment (571 bp) was obtained for isolates IE988 and IE2730 and for strains R602sp and FL27. The *nodB* sequence segment of IE988 was very similar to the *nodB* sequence segments of strains R602sp and FL27, while the *nodB* sequence of IE2730 was identical to the *nodB* sequence of *R. etli* CFN42 (Table 5).

Taken together, these results strongly support the taxonomic placement of isolate IE988 in *R. gallicum* bv. *gallicum* and the taxonomic placement of isolate IE2730 in *R. etli* bv. *phaseoli*.

## DISCUSSION

In this study we analyzed the genetic structure of rhizobial populations nodulating *P. vulgaris* plants growing in a traditionally managed milpa plot in San Miguel Acuexcomac, Mexico, over three consecutive years. This site was selected for our study because of its long history of bean cultivation that extends back to pre-Columbian times (47). In a previous study of the genetic structure of rhizobial populations associated with beans grown in six milpa plots at this site, low levels of genetic differentiation among the plots ( $G_{st} = 0.072$ ) were found, and five dominant ETs were recovered from all six plots, indicating that the population structure was stable at the spatial scale analyzed (45). Based on these findings, we decided to sample a single representative plot to study the temporal stability of the genetic structure, as well as to gain insight into the structure and dynamics of the plasmidic compartment, an issue that has not been addressed previously.

The three dominant *R. etli* ETs identified in the present work correspond to those found in the previous study (45), indicating that the genetic composition of the populations at this site is stable both in terms of space (six plots sampled in a single year [45]) and in terms of time (one plot sampled over 3

years [this study]). Furthermore, the two distinct lineages that were consistently recovered over the 3 years sampled correspond to the previously described genetic divisions I and III (45). Linkage disequilibrium analyses confirmed that recombination takes place within but not between these lineages. Importantly, the set of molecular markers analyzed in this study, along with the host range experiments, unambiguously placed our division I population in *R. gallicum* bv. *gallicum* and the division III population in *R. etli* bv. *phaseoli*. Therefore, the two lineages correspond to two distinct species and are not compartments within an *R. etli* population, as suggested previously (45). As a consequence, we concluded that the genetic structure of the *R. etli* and *R. gallicum* populations at this site is epidemic but not reticulated, as defined by Maynard Smith and colleagues (32).

Strong evidence that there is genetic exchange within but not between the *R. etli* and *R. gallicum* populations was also provided by the analysis of the plasmid compartment. Both the plasmid profiles and the *nifH* hybridization patterns provided evidence that there is plasmid transfer among distinct multilocus genotypes within each species (Fig. 1 and Table 3). The panmictic plasmid transfer pattern (48) found for both species could have been the result of the selective pressure imposed by agricultural practices, as suggested by Wernegreen and colleagues (57), or may have been an intrinsic feature of these *Rhizobium* species. The evidence that recombination took place also in the chromosomal compartment, as demonstrated by the linkage disequilibrium analyses, favors the latter possibility. Taken together, these results indicate that genetic exchange is an important source of variation and cohesion in the ecology and evolution of the two species, although it is not great enough to prevent the emergence of epidemic clones that are recovered from nodules at a high frequency. This finding may be interpreted as evidence that there is strong selective pressure imposed by the host, which favors the maintenance of particular chromosome-plasmid associations. It will be interesting to test whether the epidemic clones are particularly competitive for nodulation or if they are simply numerically dominant clones in the soil. It is important that both species nodulate the same individual plants, indicating that mechanisms other than host, spatial, or temporal isolation may account for the genetic barrier between them.

The 34 strains selected for molecular and host range analyses revealed that the subsample of 10 *R. gallicum* isolates constitutes a diverse lineage that displays three of the four 16S PCR-RFLP patterns detected, three different *nifH* hybridization patterns, and two pSym sizes (Table 3). In addition to *P. vulgaris*, these isolates effectively nodulated the other two hosts tested (Table 4). On the other hand, the 24 *R. etli* isolates effectively nodulated only *P. vulgaris*. All of the isolates displayed the same 16S PCR-RFLPs, but they harbored six pSym size classes and displayed four *nifH* hybridization patterns. The comparison of plasmid profiles, *nifH* hybridization patterns, and pSym sizes revealed the complex and dynamic structure of the plasmidic compartment within species. Generally, pSym plasmids that were the same size and had identical *nifH* hybridization patterns were associated with identical plasmid profiles. However, there were some exceptions that might indicate the existence of genetic rearrangements which affect the plasmidic compartment. These rearrangements can operate

TABLE 5. Numbers of pairwise nucleotide differences and percentages of similarity for aligned *rrs*, *glnII*, *nifH*, and *nodB* gene segments of the *R. gallicum* IE988 and *R. etli* IE2730 isolates compared with reference strains

Strain	No. of nucleotide differences (% of similarity)											
	<i>rrs</i> gene			<i>glnII</i> gene			<i>nifH</i> gene			<i>nodB</i> gene		
<i>R. gallicum</i> R602sp (U86343) <sup>a</sup>	<i>R. gallicum</i> R602sp (AF008130) <sup>a</sup>	<i>R. gallicum</i> FL27 (AF008129) <sup>a</sup>	<i>R. etli</i> CFN42 (U26916) <sup>a</sup>	<i>R. gallicum</i> R602sp (AF529015) <sup>b</sup>	<i>R. gallicum</i> FL27 (AF529016) <sup>b</sup>	<i>R. etli</i> CFN42 (AF169585) <sup>b</sup>	<i>R. gallicum</i> R602sp (AF218126) <sup>a</sup>	<i>R. gallicum</i> FL27 (M55226) <sup>a</sup>	<i>R. etli</i> CFN42 (M15942) <sup>a</sup>	<i>R. gallicum</i> R602sp (AF529022) <sup>b</sup>	<i>R. gallicum</i> FL27 (AF529021) <sup>b</sup>	<i>R. etli</i> CFN42 (M58626) <sup>a</sup>
IE988 <sup>c</sup>	5 (99.1) <sup>e</sup>	15 (97.3)	15 (97.3)	11 (98.0)	10 (98.1)	68 (86.4)	5 (98.7)	10 (97.1)	13 (96.7)	4 (99.3)	6 (98.9)	109 (80.9)
IE2730 <sup>d</sup>	12 (97.8)	20 (96.4)	18 (96.8)	2 (99.6)	73 (86.4)	25 (96.0)	15 (97.2)	14 (96.1)	0 (100)	108 (81.1)	109 (80.9)	0 (100)

<sup>a</sup> The number in parentheses is the accession number of the sequences retrieved from GenBank.  
<sup>b</sup> The number in parentheses is the accession number of the sequence generated in this study.  
<sup>c</sup> The accession numbers for *rrs*, *glnII*, *nifH*, and *nodB* gene segments of *R. gallicum* IE988 are AF529011, AF529013, AF529017, and AF529019, respectively.  
<sup>d</sup> The accession numbers for *rrs*, *glnII*, *nifH*, and *nodB* gene segments of *R. etli* IE2730 are AF529012, AF529014, AF529018, and AF529020, respectively.  
<sup>e</sup> Pairwise nucleotide difference, including gaps (percentage of similarity).



within particular strains, as extensively documented for CFN42 and NGR234 (7, 15, 38, 39), and may be coupled with lateral transfer within populations, as proposed in the present study.

Only 14% of all of the isolates examined in this study are *R. gallicum* isolates. This is in good agreement with the results of a previous study (45), in which it was reported that 10% of the isolates obtained from *P. vulgaris* corresponded to genetic division I (*R. gallicum*). In that study, however, *R. gallicum* isolates were recovered from *P. coccineus* nodules at nearly the same frequency (54%) as *R. etli* isolates. These results indicate that *R. gallicum* and *R. etli* nodulate both hosts, although the latter species is clearly more competitive for *P. vulgaris* nodulation. Thus, although *R. gallicum* was originally isolated from *P. vulgaris* nodules in France (3), this plant may not be its primary host. This possibility is further supported by the report that *R. gallicum* strains were isolated in Canada from *Onobrychis viciifolia* and *Oxytropis riparia* (tribe Galegae), suggesting that not all potential hosts for this species have been identified yet (26).

Besides its broad host range, *R. gallicum* has a wide geographic distribution, which raises a question about its biogeography. *R. gallicum* populations have been isolated from bean nodules in several European countries and Tunisia (3, 21, 33), and only one American *R. gallicum* bean isolate (strain FL27) has been reported previously (44). The present study provides the first report of an *R. gallicum* population nodulating beans in America, and it is the first population genetic analysis for the species that was performed. Sessitsch and colleagues (44) reported that the European *R. gallicum* strains can be distinguished from the Mexican FL27 strain by an RFLP resulting from a single nucleotide difference in the 16S rRNA gene, which created a *Pst*I restriction site that was absent in all the French and Austrian isolates which they analyzed but was present in the Mexican strain FL27. However, this restriction site was absent in 60% of our *R. gallicum* isolates (Table 3) and hence cannot be used to distinguish European *R. gallicum* strains from American *R. gallicum* strains. Furthermore, the plasmid profiles and nucleotide sequences of chromosomal and plasmidic genes of the Mexican population were very similar to those of *R. gallicum* type strain R602sp (in some instances even more similar than they were to those of Mexican strain FL27). These observations suggest that if *R. gallicum* was imported from America to Europe, as previously suggested (44), the lineages that gave rise to the European isolates remain in America and that the divergence between intercontinental populations is less pronounced than the divergence suggested by Sessitsch et al. (44). The presence of *R. etli* and *R. gallicum* in Tunisian soils recently cropped with beans and the absence of these organisms in fields which had not been cultivated with beans (33) further support the hypothesis that *P. vulgaris* microsymbionts were introduced by being carried along with bean seeds (36). Interestingly, *R. gallicum* bv. *phaseoli* was not present in the isolates from San Miguel Acuecomac, even though *R. etli* bv. *phaseoli* and *R. gallicum* bv. *gallicum* may have coexisted at this site for centuries. One possible explanation for this is that *R. gallicum* bv. *phaseoli* may be outcompeted by *R. etli* bv. *phaseoli* and *R. gallicum* bv. *gallicum* strains. An alternative explanation is that since *R. leguminosarum* has not been found in Mexico, the hypothesized bridge for the conjugal transfer of pSym from *R. etli* bv.

*phaseoli* to *R. gallicum* is missing (3). Perhaps the introduction of common beans along with their seed-borne symbionts to other continents exerted selective pressure and provided the ecological opportunity for lateral transfer of symbiotic information to resident *Rhizobium* populations, as in the case of the symbiotic island acquired by saprophytic *Mesorhizobium* spp. native soil populations in New Zealand (52).

In conclusion, our data are consistent with the biogeographical hypothesis of an American origin of the *R. gallicum* lineage (44), a view that is also consistent with the report of Canadian *R. gallicum* isolates obtained from *O. viciifolia* and *O. riparia* (26). Alternatively, however, *R. gallicum* could have a wide geographical distribution and a long evolutionary history of adaptation to different environments and leguminous hosts. Further research is clearly needed to examine these alternative hypotheses. We are currently analyzing the sequences of several chromosomal and plasmidic genes of *R. gallicum* isolates from different continents and hosts in order to elucidate the phylogeographic origin and dispersal pathways of this species.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CONACyT grant 27557-M to V.S. and by a Ph.D. fellowship to C.S.

We thank the community of San Miguel, especially the Aguilar family, for their kindness and help with fieldwork. B. Gaut is gratefully acknowledged for providing sequencing facilities at the University of California Irvine, and René Hernández is acknowledged for sequencing at IBT, UNAM. We thank Marco A. Rogel, Aldo Valera, Laura Espinosa, and Rafael Díaz for providing technical assistance and P. Burgos for designing primers PF2 and PR1. We acknowledge David Romero and Susana Brom for providing critical comments on the manuscript.

#### REFERENCES

- Aguilar, O. M., M. V. López, P. M. Riccillo, R. A. González, M. Pagano, D. H. Grasso, A. Puhler, and G. Favelukes. 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3520-3524.
- Amarger, N., M. Bours, F. Revoy, M. R. Allard, and G. Laguerre. 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil* 161:147-156.
- Amarger, N., V. Macheret, and G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:996-1006.
- Anyango, B., K. J. Wilson, J. L. Beynon, and K. E. Giller. 1995. Diversity of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4016-4021.
- Brockwell, J., P. J. Bottomley, and J. E. Thies. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174:143-180.
- Brom, S., A. García de los Santos, L. Cervantes, R. Palacios, and D. Romero. 2000. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* 44:34-43.
- Brom, S., A. García de los Santos, M. de Lourdes Girard, G. Dávila, R. Palacios, and D. Romero. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 173:1344-1346.
- Brom, S., L. Girard, A. García-de los Santos, J. M. Sanjuan-Pinilla, J. Olivares, and J. Sanjuan. 2002. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2555-2561.
- Brom, S., E. Martínez, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:280-283.
- Diouf, A., P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kersters, M. Gillis, E. Martínez-Romero, and M. Gueye. 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:159-170.
- Eardly, B. D., F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:507-512.

12. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
13. Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16:374-381.
14. Feil, E. J., and B. G. Spratt. 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:561-590.
15. Flores, M., P. Mavingui, X. Perret, W. J. Broughton, D. Romero, G. Hernández, G. Dávila, and R. Palacios. 2000. Prediction, identification, and artificial selection of DNA rearrangements in *Rhizobium*: toward a natural genomic design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9138-9143.
16. García de los Santos, A., S. Brom, and D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:119-125.
17. Gepts, P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Econ. Bot.* 44:28-38.
18. Gepts, P., and F. A. Bliss. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ. Bot.* 42:86-104.
19. Hagen, M. J., and J. L. Hamrick. 1996. A hierarchical analysis of population genetic structure in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Mol. Ecol.* 5:177-186.
20. Hebert, P. D. N., and M. J. Beaton. 1993. Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories, Beaumont, Tex.
21. Herrera-Cervera, J. A., J. Caballero-Mellado, G. Laguerre, H. V. Tichy, N. Requena, N. Amarger, E. Martínez-Romero, J. Olivares, and J. Sanjuan. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:87-97.
22. Kaplan, L., and T. F. Lynch. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Columbian agriculture. *Econ. Bot.* 53:261-272.
23. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
24. Laguerre, G., M. P. Fernández, V. Edel, P. Normand, and N. Amarger. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:761-767.
25. Laguerre, G., E. Geniaux, S. I. Mazurier, R. Rodríguez Casartelli, and N. Amarger. 1992. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* 39:412-419.
26. Laguerre, G., P. van Berkum, N. Amarger, and D. Prevost. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4748-4758.
27. Louvrier, P., G. Laguerre, and N. Amarger. 1996. Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4202-4205.
28. Martínez, 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.
29. Martínez-Romero, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil*, in press.
30. Martínez-Romero, E., and J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:113-140.
31. Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
32. Maynard Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4384-4388.
33. Mhamdi, R., M. Jebara, M. E. Aouani, R. Ghir, and M. Mars. 1999. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. *Biol. Fertil. Soils* 28:313-320.
34. Mhamdi, R., G. Laguerre, M. E. Aouani, M. Mars, and N. Amarger. 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:77-84.
35. Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, N.Y.
36. Pérez-Ramírez, N. O., M. A. Rogel, E. Wang, J. Z. Castellanos, and E. Martínez-Romero. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:289-296.
37. Rodríguez, C., and D. Romero. 1998. Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. *Genetics* 149:785-794.
38. Romero, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M. L. Girard, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173:2435-2441.
39. Romero, D., J. Martínez-Salazar, L. Girard, S. Brom, G. Dávila, R. Palacios, M. Flores, and C. Rodríguez. 1995. Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bacteriol.* 177:973-980.
40. Schofield, P. R., A. H. Gibson, W. F. Dudman, and J. M. Watson. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmid in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2942-2947.
41. Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios, and E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426-433.
42. Segovia, L., J. P. Young, and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
43. 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.
44. Sessitsch, A., H. Ramírez-Saad, G. Hardarson, A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 1997. Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1097-1101.
45. Silva, C., L. E. Eguiarte, and V. Souza. 1999. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.* 8:277-287.
46. Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.
47. Souza, V., J. Bain, C. Silva, V. Bouchet, A. Valera, E. Márquez, and L. E. Eguiarte. 1997. Ethnomicrobiology: do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*? *J. Ethnobiol.* 17:249-266.
48. Souza, V., and L. E. Eguiarte. 1997. Bacteria gone native vs. bacteria gone awry: plasmidic transfer and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5501-5503.
49. Souza, V., L. E. Eguiarte, G. Avila, R. Cappello, C. Gallardo, J. Montoya, and D. Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1260-1268.
50. Souza, V., T. T. Nguyen, R. R. Hudson, D. Piñero, and R. E. Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8389-8393.
51. Spink, H. P., A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas. 1998. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
52. Sullivan, J. T., H. N. Patrick, W. L. Lowther, D. B. Scott, and C. W. Ronson. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal and symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8995-8999.
53. Swofford, D. L. 2002. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony and other methods, 4.0 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
54. Wacek, T., and W. J. Brill. 1976. Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soybean. *Crop Sci.* 16:519-522.
55. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletie, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
56. Wernegreen, J., and M. A. Riley. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Biol. Evol.* 16:98-113.
57. Wernegreen, J. J., E. E. Harding, and M. A. Riley. 1997. *Rhizobium* gone native: unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5483-5488.
58. Whittam, T. S. 1990. ETDIV and ETCLUS programs. Pennsylvania State University, University Park.
59. Workman, P. L., and J. D. Niswander. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Genet.* 22:24-49.
60. 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.

## CAPITULO III.- ANALISIS POBLACIONAL A NIVEL MOLECULAR

### III.1 Metodología

#### III.1.1 Secuenciación y alineamiento

Las secuencias de los genes *rrs*, *glnII*, *nifH* y *nodB* se generaron utilizando los oligonucleótidos y condiciones descritas en Silva et al. (2003). Para amplificar y secuenciar el gen *atpD* usamos los oligonucleótidos *atpD273* y *atpD771* descritos en Gaunt et al. (2001), alineados a 55 °C. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el programa ClustalW implementado en Bioedit (Hall, 1999). El alineamiento de todos los genes fue sencillo y no involucró indels. Tanto para los análisis de los genes individuales como para los de combinaciones de genes, las secuencias idénticas se consideraron como un solo haplotipo. Las secuencias o combinaciones de secuencias idénticas se detectaron con el programa DAMBE (Xia y Xie, 2001).

#### III.1.2 Parámetros poblacionales y patrones de sustitución

Utilizamos los programas DnaSP v3.5 (Rozas y Rozas, 1999) y MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001) para estimar varios parámetros poblacionales de diversidad genética, como el número de sitios variables (S), el número promedio de diferencias apareadas entre secuencias (k), la diversidad nucleotídica promedio observada por sitio ( $\pi$ ) y variación esperada por sitio si la evolución es neutral ( $\theta$ ), así como el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones.

#### III.1.3 Prueba de neutralidad de Tajima y detección de selección

La prueba de neutralidad de Tajima se basa en estimar la diferencia entre la diversidad observada ( $\pi$ ) y la diversidad esperada en cada sitio si la evolución es neutral ( $\theta$ ). Si el índice de Tajima (D) es igual a 0, significa que las secuencias evolucionan de manera neutral; si es mayor que 0, significa que la diversidad observada es mayor que la esperada y se interpreta como que puede haber selección positiva o diversificadora; si es menor que 0 significa que las secuencias pueden estar bajo los efectos de selección negativa o purificadora (Li, 1997; Nei y Kumar, 2000; Page y Holmes, 1998). Las estimaciones de D se hicieron con el programa DnaSP (Rozas y Rozas, 1999).

Una manera un poco más empírica de reconocer efectos selectivos sobre las secuencias es comparar el número de sustituciones sinónimas ( $d_S$ ) y no sinónimas ( $d_N$ ). En la mayoría de los genes que codifican para proteínas las sustituciones no sinónimas (que afectan particularmente a las posiciones primera y segunda de los codones) están bajo restricciones funcionales (selección

negativa) por lo que su tasa de sustitución es menor que las sinónimas ( $d_N < d_S$ ). Si hay selección positiva o diversificadora ocurrirán más cambios no sinónimos que sinónimos ( $d_N > d_S$ ), y si están sujetos a una fuerte selección negativa o purificadora las sustituciones no sinónimas serán mucho menores que las sinónimas ( $d_N \ll d_S$ ). En ambos casos se rechaza la hipótesis de neutralidad (Li, 1997; Nei y Kumar, 2000; Page y Holmes, 1998).

### III.1.4 Splits decomposition

Con los análisis de *splits decomposition* es posible representar de manera gráfica el grado de conflicto filogenético entre sitios informativos de un alineamiento múltiple de secuencias (Huson, 1998; Page y Holmes, 1998). Las gráficas de *splits decomposition* permiten visualizar la existencia de posiciones que producen señales filogenéticas incompatibles, a través de la formación de retículas o redes entre las secuencias portadoras de señales conflictivas. La recombinación homóloga puede ser uno de los mecanismos en la generación de dichos conflictos (Brown, et al., 2002). El grado de recombinación que ha afectado a un conjunto de secuencias queda reflejado en la topología de gráfica de splits; si es de tipo-árbol (sin reticulaciones) se interpreta como que no ha habido recombinación que genere señales conflictivas, y si es de tipo-red (con reticulaciones) se interpreta como que dentro de las secuencias ha habido eventos de recombinación que generan señales conflictivas (Brown, et al., 2002; Huson, 1998; Page y Holmes, 1998). En este último caso a veces es posible determinar cuáles son las secuencias que crean los conflictos. Para determinar el grado de señales conflictivas entre las secuencias se utilizó el análisis de *splits decomposition* implementado por el programa Splits Tree v.2.4, utilizando los sitios variables y la distancia Hamming (Huson, 1998).

### III.1.5 Prueba de incongruencia (ILD)

La prueba de homogeneidad de particiones, conocida como *incongruence length difference test* (ILD), evalúa estadísticamente la hipótesis nula de congruencia entre grupos de datos (Brown, et al., 2002; Farris et al., 1994; Lecointre et al., 1998). Las secuencias de al menos dos *loci* ( $x$  y  $y$ ) se alinean concatenadamente y se hacen análisis de parsimonia para el conjunto de datos  $x$  y para el conjunto de datos  $y$ . La longitud de cada árbol más parsimonioso se suma ( $L_x + L_y$ ), y esta longitud se compara con la suma de las longitudes ( $L_p + L_q$ ) de los árboles más parsimoniosos obtenidos de dos grupos de datos,  $p$  y  $q$ , del mismo tamaño de los conjuntos de datos originales y generadas por la partición al azar del alineamiento del par de datos originales. Si en la mayoría de los casos la longitud de los árboles generados al azar es mayor que la de los árboles originales, significa que hay más

incongruencia entre las particiones que lo esperado por azar, por lo que se rechaza la hipótesis nula (Brown, et al., 2002; Farris, et al., 1994; Lecointre, et al., 1998). La prueba se realizó con el programa PAUP\* (Swofford, 2002), utilizando 1000 réplicas de particiones y el método de búsqueda heurístico. Un valor de  $P < 0.05$  sugiere que los conjuntos de datos son incongruentes.

La incongruencia entre genes de una población puede ser resultado de eventos de recombinación, lo cual indica que los genes tienen historias evolutivas diferentes. Cuando estos eventos involucran a sólo algunos de los individuos del muestreo, es posible detectar visualmente a partir de la topología de los árboles de parsimonia cuáles son las combinaciones que generan la incongruencia. La eliminación del análisis de estos individuos puede elevar significativamente el nivel de congruencia entre las particiones. Si se establece que dos o más *loci* son filogenéticamente congruentes, significa que comparten sus historias evolutivas y que pueden analizarse juntos para generar filogenias o genealogías más robustas, congruentes con la filogenia de los organismos.

## III.2 Resultados

En esta sección analizamos las relaciones genéticas y los patrones de evolución de secuencias nucleotídicas parciales de 3 genes cromosomales (*rrs*, *glnII* y *atpD*) y de 2 genes asociados al plásmido simbiótico (*nifH* y *nodB*). Estos datos nos permitieron conocer los patrones de evolución molecular de 35 de los aislados de San Miguel, seleccionados en base a los análisis de MLEE y perfiles de plásmidos (Silva, et al., 2003). Se incluyeron los 34 aislados analizados en la Tabla 3 de Silva et al. (2003) y el aislado IE2755 de la población de *R. etli*, por pertenecer a un ET distante del grupo de ETs abundantes (ET22 en Fig. 1 (Silva, et al., 2003)).

### III.2.1 Diversidad genética del gen *rrs*

Los 6 aislados de *R. etli* presentaron el mismo alelo *rrs* (Tabla 1 y Fig. 1a), por lo que la diversidad genética fue nula (Tabla 2a). Aunque estos aislados tienen patrones de MLEE diferentes, al parecer no ha transcurrido suficiente tiempo como para acumular mutaciones en el gen *rrs*. Por otro lado, entre los 6 aislados de *R. gallicum* secuenciados se observaron 4 haplotipos (Tabla 1 y Tabla 2a). Los aislados 5 y 10 compartieron el mismo haplotipo y el aislado 9 tuvo un alelo relacionado con éste (Fig. 1a). Los aislados 3 y 7 tuvieron el mismo haplotipo, pero poco relacionado con los 3 haplotipos anteriores. El aislado 2 mostró un alelo muy divergente con respecto al grupo 9, 5 y 10, más cercano al alelo del grupo 3 y 7, pero claramente diferente (Fig. 1a).

El índice de Tajima para los 5 genes analizados no fue significativamente diferente de 0 (Tabla 2). Sin embargo, la evaluación de este índice para detectar selección ha mostrado que tiene un poder limitado cuando el tamaño de muestra es menor de 50 (Cummings y Clegg, 1998), por lo que en adelante sólo discutiremos si fue positivo o negativo. El índice de Tajima para el gen *rrs* fue menor que 0, lo cual da indicios de que este gen está bajo selección purificadora (Tabla 2a).

El análisis de *splits decomposition* muestra que existen señales filogenéticas conflictivas en este gen, en particular entre los aislados 2, 3 y 7 de *R. gallicum* y las demás secuencias (Fig. 2a). La inusual variabilidad genética de este gen en la población de *R. gallicum* y la existencia de señales conflictivas en su secuencia, pueden ser evidencia de eventos de recombinación. Ello implica que las relaciones entre haplotipos *rrs* de *R. gallicum* no pueden ser representadas adecuadamente por los tradicionales árboles de ramificación dicotómica, sino preferentemente por gráficas reticuladas como las del *splits decomposition*.

### III.2.2 Diversidad genética del gen *glnII*

Entre las 9 secuencias de *R. gallicum*, sólo 2 correspondieron a un mismo haplotipo, proveniente de los aislados 3 y 7, que junto con el aislado 2, formaron el grupo más divergente (Tabla 1, Fig. 1b y Tabla 2b). El gen *glnII* mostró mucha mayor variabilidad que el gen *rrs* para los aislados de *R. etli*, como era de esperarse para un gen que codifica proteínas (Tabla 2b). Entre las 21 secuencias de *R. etli* encontramos sólo 7 haplotipos (Tabla 1), con un alelo predominante derivado de 10 de los aislados (12-2755, Fig. 1b). Los aislados 28 y 29 compartieron haplotipo *glnII*, siendo éste el más divergente dentro de la población de *R. etli* (Fig. 1b). Aunque el número de secuencias de *R. etli* fue mayor que el de *R. gallicum*, en este caso también se observó una mayor diversidad genética dentro de la población de *R. gallicum* (Tabla 2b). El índice de Tajima fue un poco mayor que 0 para las secuencias de *R. gallicum*, lo cual sugiere selección diversificadora, y menor que 0 para las secuencias de *R. etli*, lo cual indica selección purificadora (Tabla 2b).

El análisis de *splits decomposition* no evidenció señales filogenéticas conflictivas para separar a ambas especies, ni dentro de ellas, al no existir reticulaciones (Fig. 2b). Este análisis confirma que las relaciones entre *R. etli* y *R. gallicum* pueden ser representadas mediante árboles, como el que presentamos en la Figura 1b. Tanto las relaciones filogenéticas (Fig. 1b) como los análisis de *splits decomposition* (Fig. 2b) muestran la clara separación de ambas especies y su elevado coeficiente de diferenciación (Tabla 2b) muestran que *R. etli* y *R. gallicum* son dos linajes evolutivos distintos.

### III.2.3 Diversidad genética del gen *atpD*

Entre las 5 secuencias del gen *atpD* de los aislados de *R. gallicum* se encontraron 3 haplotipos (Tabla 1 y Tabla 2c). Uno de los haplotipos lo compartieron los aislados 5 y 10 (Fig. 1c), como en el caso del gen *rrs*. Los aislados 2 y 7 presentaron alelos idénticos y relacionados con el alelo del aislado 3 (Fig. 1c). Estas relaciones apoyan los resultados principalmente del gen *glnII* y parcialmente los del gen *rrs*, ya que muestran que los aislados 5 y 10 claramente pertenecen a linajes centrales dentro de *R. gallicum* y que los aislados 2, 3 y 7 pertenecen a un grupo divergente de *R. gallicum* (Fig. 1a, b y c). El gen *rrs* agrupó a los aislados 3 y 7 y los separó del aislado 2 (Fig. 1a), mientras que los genes *glnII* y *atpD* los relaciona cercanamente (Fig. 1b), e inclusive para el gen *atpD* los aislados 2 y 7 muestran un alelo idéntico (Fig. 1c). Entre las 7 secuencias del gen *atpD* de los aislados de *R. etli* se encontraron sólo 2 haplotipos (Tabla 1 y Fig. 1c), diferenciados por 2 mutaciones transicionales (Tabla 2c). En este caso la población de *R. etli* también mostró una diversidad genética mucho menor que la de *R. gallicum* (Tabla 2c). Para ambas poblaciones el índice D de Tajima fue igual a 0, lo cual indica claramente que este gen evoluciona de manera neutral (Tabla 2c).

El análisis de *splits decomposition* muestra que no existen señales filogenéticas conflictivas en las comparaciones inter o intraespecíficas (Fig. 2c), lo que indica que su evolución y relaciones puede ser representadas por el árbol mostrado en la Figura 1c, donde se observa que los alelos de *R. etli* y *R. gallicum* están fuertemente diferenciados. Al igual que para el gen *glnII*, las relaciones filogenéticas (Fig. 1c), los análisis de *splits decomposition* (Fig. 2c) y el elevado coeficiente de diferenciación (Tabla 2b) del gen *atpD*, muestran que *R. etli* y *R. gallicum* son dos linajes evolutivos claramente diferenciados.

### III.2.4 Diversidad genética del gen *nifH*

Ninguno de los 10 aislados de *R. gallicum* analizados compartió haplotipo *nifH* (Tabla 1 y Tabla 2d). En contraste con los resultados de los genes cromosomales, el grupo divergente constituido por los aislados 2, 3 y 7 no se sustenta, demostrando una evolución paralela e independiente de los marcadores cromosomales y plasmídicos. Entre las 23 secuencias de los aislados de *R. etli* se encontraron sólo 7 haplotipos *nifH* (Tabla 1 y Tabla 2d), 2 de ellos presentes en 7 (12-2755, Fig. 3a) y 8 (11-31, Fig. 3a) de los aislados. Al igual que en el caso de los genes cromosomales, la población de *R. gallicum* mostró mayor diversidad genética en el gen *nifH* que la población de *R. etli* (Tabla 2d).

El análisis de *splits decomposition* muestra que en general la señal filogenética de este gen no es conflictiva para *R. etli*, aunque si se detectan conflictos entre algunas de las secuencias de *R. gallicum* (Fig. 4a). Las relaciones filogenéticas (Fig. 3a) y los análisis de *splits decomposition* (Fig. 4a) del gen *nifH* muestran la separación de ambas especies, aunque su distancia genética y coeficiente de diferenciación (Tabla 2d) no son muy altos, *R. etli* y *R. gallicum* se separan sin ambigüedades en dos linajes evolutivos independientes.

El gen de la nitrogenasa fue el menos variable de los genes de proteínas (Tabla 2d). Este resultado concuerda con la poca variabilidad genética encontrada para esta enzima en otros estudios (Haukka, et al., 1998; Laguerre, et al., 2001). Entre las secuencias parciales de los genes analizados, *nifH* es la más corta (Tabla 2d), sin embargo, la secuencia completa de las tres copias de *nifH* del aislado IE1004 de *R. etli* (número de colección 30), mostró que el resto del gen no muestra más variación y que las 3 copias son idénticas (Sepúlveda, 2003). En dicho trabajo Sepúlveda (2003) propone que la familia génica *nifH* está sujeta a procesos de conversión génica que mantienen la homogeneidad de las secuencias, este proceso se ha documentado en trabajos de laboratorio en el que se manipulan la variación nucleotídica de las 3 copias de *nifH* en la cepa CFN42 de *R. etli* (Rodríguez y Romero, 1998). Tanto para *R. etli* como para *R. gallicum* el índice D de Tajima estuvo por debajo de 0 (Tabla 2d), lo cual apoya que este gen está sujeto a una fuerte selección purificadora. Todo parece indicar que la poca variabilidad del gen *nifH* se relaciona con una fuerte selección purificadora y posiblemente con eventos de conversión génica.

### III.2.5 Diversidad genética del gen *nodB*

Se detectaron 7 haplotipos entre las 9 secuencias del gen *nodB* de *R. gallicum* (Tabla 1 y Tabla 2e). Este gen muestra agrupaciones contrastantes con las generadas a partir de los genes cromosomales; al igual que con el gen *nifH*, la separación del grupo de los aislados 2, 3 y 7 no se sustenta (Fig. 3b). Estos resultados sugieren que a pesar de que los aislados 2, 3 y 7 son un linaje divergente dentro de *R. gallicum*, comparten el acervo de genes simbióticos de la especie. Entre las 11 secuencias de *R. etli* se encontraron 6 haplotipos (Tabla 1 y Tabla 2e). Encontramos una mayor diversidad genética en las secuencias *nodB* de los aislados de *R. etli* que de *R. gallicum* (Tabla 2e), contrastando con la tendencia en los genes cromosomales y *nifH*.

El análisis de *splits decomposition* muestra que existen una gran cantidad de señales conflictivas entre haplotipos correspondientes a la misma especie, pero no entre especies (Fig. 4b). Este resultado evidencia la existencia de transferencia lateral de información simbiótica dentro de las



especies, pero no entre ellas. El elevado coeficiente de diferenciación genética (Tabla 2e), junto con las representaciones de relaciones genéticas (Fig. 3b) y de *splits decomposition* (Fig. 4b), muestran que las secuencias del gen *nodB* de *R. etli* y *R. gallicum* siguen caminos evolutivos independientes.

El gen *nodB* fue el más variable y mostró patrones de variación diferentes a los de los otros genes. Es el único en el que las secuencias de *R. etli* fueron más diversas que las de *R. gallicum* y el que tuvo mayor número de sustituciones en las 1ª y 2ª posiciones del codón, por lo que tiene una gran cantidad de sustituciones no sinónimas, que en la población de *R. etli* son más que las sinónimas (Tabla 2e). Aunque el índice D de Tajima es ligeramente menor que 0 para ambas especies (Tabla 2e), en la población de *R. etli* este gen muestra señales de estar sujeto a un proceso de selección diversificadora que promueve la persistencia de sustituciones no sinónimas (Tabla 2e), además de estar influenciado por eventos de recombinación (Fig. 4b). Esto sugiere que el gen *nodB* de *R. etli* se encuentra en proceso de diversificación, mientras que en *R. gallicum* es el gen analizado menos variable (Tabla 2e).

### III.2.6 Análisis de congruencia filogenética entre genes cromosomales

El análisis de congruencia filogenética entre el gen *rrs* y los dos genes *glnII* y *atpD* no se pudo realizar dentro de la población de *R. etli* debido a que hubieron menos de 4 combinaciones diferentes (Tabla 3b). Dentro de la población de *R. gallicum*, los genes *rrs* y *glnII* fueron totalmente congruentes (Tabla 3a), lo que sugiere que estos datos podrían ser combinados para generar una filogenia más robusta. La congruencia entre los genes *rrs* y *atpD* fue mucho menor (Tabla 3a), lo cual indica que estos genes contiene señales filogenéticas conflictivas. Al incluir las secuencias de *R. etli* en el análisis, se encuentra un valor de congruencia bajo (Tabla 3c). Esto sugiere que las secuencias de *rrs* y *atpD* tiene historias evolutivas diferentes, por lo que no deben combinarse.

Los genes cromosomales codificantes de proteínas (*glnII* y *atpD*) tuvieron niveles de variación similares y ambos mostraron señales filogenéticas no conflictivas (Tabla 2b y c, y Fig. 2b y c). El análisis de congruencia mostró que estos dos genes son totalmente congruentes dentro de la población de *R. gallicum* (Tabla 3a), pero menos congruentes dentro de *R. etli* (Tabla 3b), y el análisis de ambas especies juntas muestra no ser congruente (Tabla 3c). Sin embargo, la inspección visual de los árboles de los genes *glnII* y *atpD*, nos indicó que la incongruencia se debe a la combinación de alelos del aislado 26. La eliminación del aislado 26 de *R. etli* elevó significativamente la congruencia al analizar juntos a *R. etli* y *R. gallicum* (Tabla 3c), lo que muestra que este aislado puede estar involucrado en eventos de recombinación que afectan a estos genes, y

que para el resto de los aislados los genes *glnII* y *atpD* pueden analizarse combinados para generar una filogenia cromosomal más robusta que con los genes individuales.

En resumen, los genes cromosomales muestran cierto grado de congruencia entre ellos. Los pares de genes *rrs-glnII* y *glnII-atpD* fueron totalmente congruentes dentro de *R. gallicum* y el par *glnII-atpD* (eliminado el aislado 26) para ambas especies juntas. Estos resultados muestran que algunos pares de genes no tienen la misma historia evolutiva, probablemente por transferencia lateral, pero que algunas combinaciones están menos afectadas por lo que es posible utilizarlas para generar reconstrucciones filogenéticas con mayor información.

### III.2.7 Análisis de congruencia filogenética entre genes plasmídicos

Los genes simbióticos *nifH* y *nodB* fueron totalmente congruentes dentro de *R. gallicum* (Tabla 3a), lo que sugiere que estos genes comparten su historia evolutiva y pueden combinarse para generar una filogenia más robusta de *loci* simbióticos. Las secuencias de *R. etli* fueron menos congruentes (Tabla 3b). El análisis de ambas especies juntas mostró un buen nivel de congruencia (Tabla 3c). La eliminación del haplotipo representado por el aislado 20 de la población de *R. etli* (Fig. 3) tiene como efecto restaurar la congruencia entre haplotipos *nifH* y *nodB* de *R. etli* (Tabla 3b), así como en el análisis conjunto con secuencias de *R. gallicum* (Tabla 3c). Este resultado nos dice que estos aislados pueden estar involucrados en eventos de recombinación, pero que las secuencias del resto de los aislados comparten una historia evolutiva común, y que por lo tanto, las secuencias de *nifH* y *nodB* se pueden combinar para reconstruir una filogenia de genes simbióticos con mayor información.

### III.2.8 Análisis de congruencia entre genes cromosomales y genes plasmídicos

Los análisis de congruencia filogenética mostraron que los genes cromosomales y plasmídicos son totalmente incongruentes tanto dentro de *R. etli* y *R. gallicum*, como al analizarlos juntos, indicando que poseen historias evolutivas independientes (Tabla 3a, b y c). La excepción más notoria fue la combinación *rrs* y *nifH* de *R. etli* (Tabla 3b y c). Esto podría interpretarse como que este gen involucrado en la fijación de nitrógeno (*nifH*) estaba presente antes que los genes de nodulación (como *nodB*) Alternativamente se podría plantear que se adquirió recientemente junto con los genes de nodulación, ha divergido muy poco y, como sólo hay un alelo *rrs*, parecen congruentes. Los genes *rrs* y *nifH* fueron los genes menos variables (Tabla 2a y d), por lo tanto su congruencia puede ser un resultado espurio. Nos parece que las últimas dos explicaciones son las más plausibles.

La incongruencia entre las relaciones filogenéticas de los genes cromosomales y plasmídicos evidencian que estos dos compartimentos genéticos tienen historias evolutivas diferentes. Las reconstrucciones filogenéticas muestran que los genes plasmídicos tienen un ancestro común más reciente que los genes cromosomales (ver más adelante Capítulo IV), señalando que *R. gallicum* y *R. etli* ya habían divergido cuando adquirieron la capacidad simbiótica.

### III.2.9 Análisis comparativo entre marcadores moleculares

En base a los datos de isoenzimas, perfiles de plásmidos y patrones de RFLP de *nifH*, de los 35 aislados seleccionados (Tabla 3 en Silva et al. 2003), construimos árboles UPGMA para mapear sobre ellos los alelos asignados (Tabla 1) de los genes secuenciados *rrs*, *glnII*, *atpD*, *nifH* y *nodB*. A continuación discutimos las asociaciones que se presentan entre los diferentes marcadores genéticos.

En la Figura 5 podemos ver que *R. etli* y *R. gallicum* no compartieron ningún haplotipo de los genes cromosomales *rrs*, *glnII* y *atpD*, y que existe cierto grado de asociación entre los genotipos multilocus (ETs) y los alelos de los genes cromosomales. Algunos haplotipos se encontraron únicamente entre los aislados de un mismo ET, pero otros se encontraron asociados a ETs diferentes. Esto indica que a nivel cromosomal la estructura genética de estas poblaciones tiene componentes tanto clonales como de recombinación y que los datos de secuencias proveen mayor resolución que los de MLEE.

El mapeo de los haplotipos derivados de los genes simbióticos sobre los perfiles de plásmidos (Fig. 6) muestra que *R. etli* y *R. gallicum* tampoco comparten alelos de genes simbióticos. Dentro del compartimiento plasmídico de *R. etli* se encuentran algunas asociaciones; así por ejemplo, el perfil P1 estuvo predominantemente asociado con el haplotipo 2 de *nifH* y *nodB*, patrón de copias *nifH* A1 y plásmidos simbióticos grandes (450 y 550 kb); el perfil P2 y el perfil P5 presentaron el haplotipo 1 de *nifH* y *nodB*, patrones *nifH* tipo B y plásmidos simbióticos chicos (390 kb), y el P3 mostró predominantemente el haplotipo 4 de *nifH* y *nodB*, patrón de copias *nifH* A2 y plásmidos simbióticos chicos (390 kb). Estos patrones de asociación fueron consistentes en la mayoría de los casos, sin embargo, algunas excepciones encontradas pueden ser el resultado de rearrreglos dentro del compartimiento plasmídico y/o de transferencia lateral entre aislados. Dentro de *R. gallicum* no se encontraron asociaciones entre los perfiles de plásmidos y los alelos simbióticos.

En la Figura 7 se muestran las asociaciones entre patrones de RFLP de *nifH*, los alelos *nifH* y *nodB* y el tamaño del plásmido simbiótico, las cuales revelan que dentro de *R. etli* existen tres tipos principales de plásmidos simbióticos. La diversidad de alelos encontrados en *R. gallicum* no permite

detectar asociaciones entre haplotipos y patrones de RFLP de *nifH*, aunque el patrón *nifH* es el mismo en la mayoría de los casos.

En ambas especies el mapeo de los marcadores simbióticos sobre los ETs cromosomales muestra un bajo nivel de asociación (Fig. 8). Por ejemplo, dentro del *R. etli* los tres tipos de plásmidos simbióticos (mostrados en la Figura 7) se pueden encontrar tanto en aislados con el mismo ET como en ETs diferentes. La gran diversidad genética e incongruencia filogenética de los marcadores cromosomales y plasmídicos de la población de *R. gallicum* no permite encontrar asociaciones significativas (Fig. 8).

La comparación de los compartimentos cromosomales y plasmídicos sugiere que dentro de *R. etli* existen combinaciones plasmídicas que se transfieren entre genotipos cromosomales y que en *R. gallicum*, bajo una arquitectura plasmídica semejante, se alberga una gran diversidad alélica, que podría ser resultado de eventos de recombinación. Estos resultados apoyan las conclusiones derivadas de la comparación de perfiles de plásmidos y ETs (Silva, et al., 2003), demostrando que la transferencia lateral de plásmidos ocurre dentro de las poblaciones de ambas especies, pero no entre ellas. La conclusión derivada de los análisis de desequilibrio de ligamiento sobre la transferencia de genes cromosomales dentro, pero no entre ambas especies (Silva, et al., 2003), se ve asimismo reforzada con los datos de secuencia de los genes cromosomales.

### III.3 Discusión

En nuestros estudios espacial (Silva, et al., 1999) y temporal (Silva, et al., 2003) de la estructura genética de las poblaciones de *Rhizobium* en las milpas de San Miguel, encontramos que *R. etli* y *R. gallicum* se encuentran nodulando a *P. vulgaris* (Silva, et al., 1999; Silva, et al., 2003) y *P. coccineus* (Silva, et al., 1999). *R. etli* fue el microsimbionte predominante entre los aislados de *P. vulgaris*, mientras que *R. gallicum* lo fue de *P. coccineus* (Silva, et al., 1999), lo que muestra que estas especies comparten el nicho de los nódulos de frijoles, pero en diferentes proporciones. Además, los experimentos de rango de hospedero mostraron que *R. gallicum* tiene un nicho simbiótico más amplio que *R. etli* (Tabla 4 en Silva et al. 2003). Asimismo, la infectividad y eficiencia simbiótica de ambas especies fue diferente en los tres hospederos ensayados, lo cual indica que tienen nichos diferenciados, si bien parcialmente sobrelapados.

Todos los marcadores genéticos analizados indican que a pesar de ser poblaciones simpátricas que comparten el nicho de los nódulos del frijol (la mitad de las plantas estuvieron noduladas por ambas especies), las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum* no comparten sus acervos genéticos. Para los

5 genes analizados, los análisis de *splits decomposition* mostraron que en todos los casos no hay ambigüedad en la separación de ambas especies, y las reconstrucciones filogenéticas mostraron la clara separación de ambos grupos. Estos resultados confirman nuestra conclusión basada en análisis de desequilibrio de ligamiento sobre el aislamiento sexual entre las poblaciones de ambas especies (Silva, et al., 1999; Silva, et al., 2003). Por otro lado, en algunos casos el análisis intrapoblacional mostró señales conflictivas e incongruencia entre los marcadores cromosomales, entre los marcadores plasmídicos y sobre todo entre los marcadores cromosomales y plasmídicos, lo cual apoya nuestra conclusión sobre la existencia de intercambio genético circunscrito a cada especie a nivel cromosomal y plasmídico (Silva, et al., 1999; Silva, et al., 2003).

Los coeficientes de diferenciación entre *R. etli* y *R. gallicum* fueron altos, sobre todo para los genes más variables. El número de sitios informativos aumentó notoriamente al analizar juntas a ambas especies. En el caso del gen *atpD*, las secuencias de ambas especies no tuvieron sitios informativos dentro de sus poblaciones y al analizarlas juntas el número de sitios informativos aumentó a 50 (Tabla 2c). Asimismo, la diversidad genética y el número de diferencias aumentaron a más del doble en la mayoría de los casos. Estos resultados muestran que además de tener nichos ecológicos diferentes, aunque sobrelapados, la variación genética se distribuye de manera diferente dentro de cada una de las especies y tienen patrones de evolución molecular diferentes.

El conjunto de marcadores y análisis genéticos separan claramente a las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum*, por lo que estas especies están sustentadas en base a los conceptos de especie basados en similitud. A este nivel, los análisis de grupos mostraron que las dos especies se separan en grupos monofiléticos, por lo que los conceptos de especie basados en monofilia apoyan la existencia de estas dos especies. La evidencia de intercambio genético dentro de las poblaciones de *R. etli* y de *R. gallicum*, junto con la evidencia de aislamiento genético entre ellas, muestra que estas poblaciones además se apegan al concepto biológico de especie. En conjunto, los análisis de diferenciación genética y la diferenciación en su nicho ecológico, muestran que éstas son entidades evolutivas independientes y con caminos evolutivos propios, es decir, se apegan al concepto evolutivo de especie. En conclusión, los análisis poblacionales de *R. etli* y *R. gallicum* de las milpas de San Miguel muestran que estas especies se apegan a la definición evolutiva de especie, son linajes separados que evolucionan bajo sus propias tendencias ecológicas y evolutivas.

Dado que una gran parte del ciclo de vida de los rizobios ocurre en el suelo, y que sólo una fracción de la población es la que se encuentra en los nódulos, el estudio de las poblaciones del suelo

permitiría aplicar estas conclusiones a la totalidad de las poblaciones, y seguramente expandiría nuestro conocimiento sobre la ecología y evolución de estas bacterias.

**Tabla 1.-** Haplotipos de los genes *rrs*, *glnII*, *atpD*, *nifH* y *nodB* de 35 aislados obtenidos de nódulos de *P. vulgaris* y cepas de referencia. Se indica el número de colección, el genotipo multilocus (ET) y los haplotipos asignados para cada aislado. Para las cepas de referencia, se indica el número de accesión de las secuencias obtenidas del GenBank .

Número de colección	ET	<i>rrs</i> 559 nt	<i>glnII</i> 540 nt	<i>atpD</i> 441 nt	<i>nifH</i> 387 nt	<i>nodB</i> 516 nt
<i>R. gallicum</i>						
1.IE992	4		15		15	10
2.IE2751	19	5	9	4	11	11
3.IE4868	40	4	8	5	14	13
4.IE4872	8		11		10	
5.IE2703	4	2	13	3	17	9
6.IE4845	38		12		9	11
7.IE2735	16	4	8	4	16	7
8.IE2729	15				13	8
9.IE988	12	3	10		8	12
10.IE4770	29	2	14	3	12	7
<i>R. etli</i>						
11.IE4810	6		5		2	2
12.IE4813	32		1		1	
13.IE4794	31	1			4	5
14.IE4803	5		3		2	
15.IE4815	33		2		3	
16.IE4876	43		1		2	3
17.IE954	1		6			
18.IE4777	1		5		2	
19.IE963	1		1			
20.IE2730	1	1	1	1	1	1
21.IE4804	1	1	1	1	4	
22.IE4877	1		1		1	
23.IE994	1				1	
24.IE1006	1				2	
25.IE1009	1	1	5	1	3	6
26.IE2737	2		3	2	2	
27.IE4795	2		3		2	2
28.IE950	2		7	2	4	4
29.IE2704	2	1	7	2	5	
30.IE1004	2		4		6	
31.IE4874	3		1		2	2
32.IE951	3				1	1
33.IE4837	3		1		1	1
34.IE4771	3		1		7	
35.IE2755	22	1	1	1	1	1
CFN42	44	1.1 U28916	7.1	<i>R. t</i> AJ294404	1 M15942	1 M58626
FL27		3.1 AF008129	10.1	3.1	4.1 M55226	11.1
R602sp		3.1 U86343	10.1	3.1	6.1 AF218126	11
USDA1844		2.1 U89817	10.1	3.1	-----	<i>S. m</i>

**Tabla 2.-** Tabla de parámetros poblacionales para las secuencias de los genes **a) *rrs***, **b) *glnII***, **c) *atpD***, **d) *nifH***, y **e) *nodB***. Se indica el número de secuencias, haplotipos, sitios variables, sitios informativos, sustituciones sinónimas/no sinónimas y diferencias promedio, así como, la diversidad por sitio ( $\pi$ ), la diversidad esperada ( $\theta$ ) y el índice D de Tajima. NP significa que no es posible el análisis.

**a) *rrs* (559 nt)**

Población	% G+C	No. secs	No. haplos	No. vars	No. infors	No. difs(k)	Div. ( $\pi$ )	Div. ( $\theta$ )	Tajima D
<i>R. gallicum</i>	55.3	6	4	29	6	16.8	0.030	0.028	-0.67
<i>R. etli</i>	56.0	6	1	0	0	0	NP	NP	NP
Total	55.4	12	5	29	14	15.7	0.028	0.029	

Coeficiente de diferenciación= NP

**b) *glnII* (540 nt = 180 aa)**

Población	% G+C	No. secs	No. haplos	No. vars	No. infors	No. sins/ no sins	No. difs (k)	Div. ( $\pi$ )	Div. ( $\theta$ )	Tajima D
<i>R. gallicum</i>	60.2	9	8	37	30	35/2	15.4	0.028	0.026	0.41
<i>R. etli</i>	62.1	21	7	27	4	26/1	8.7	0.016	0.020	-1.21
Juntas	61.1	30	15	100	86	87/14	43.3	0.080	0.057	

Coeficiente de diferenciación= 0.739

**c) *atpD* (441 nt = 147 aa)**

Población	% G+C	No. secs	No. haplos	No. vars	No. infors	No. sins/ no sins	No. difs (k)	Div. ( $\pi$ )	Div. ( $\theta$ )	Tajima D
<i>R. gallicum</i>	61.1	5	3	16	0	15/1	10.7	0.024	0.024	0
<i>R. etli</i>	62.5	7	2	2	0	2/0	2	0.005	0.005	0
Total	61.6	12	5	60	50	54/6	34.4	0.078	0.065	

Coeficiente de diferenciación= 0.827

**d) *nifH* (387 nt =129 aa)**

Población	% G+C	No. secs	No. haplos	No. vars	No. infors	No. sins/ no sins	No. difs (k)	Div. ( $\pi$ )	Div. ( $\theta$ )	Tajima D
<i>R. gallicum</i>	61.8	10	10	30	10	28/2	8.2	0.022	0.027	-1.21
<i>R. etli</i>	61.9	23	7	14	2	13/1	4.5	0.012	0.015	-1.19
Total	61.8	33	17	43	18	40/3	9.3	0.024	0.033	

Coeficiente de diferenciación= 0.319

**e) *nodB* (516 nt = 171 aa + 1 alto)**

Población	% G+C	No. secs	No. haplos	No. vars	No. infors	No. sins/ no sins	No. difs (k)	Div. ( $\pi$ )	Div. ( $\theta$ )	Tajima D
<i>R. gallicum</i>	59.9	9	7	17	9	15/4	7.5	0.015	0.013	-0.20
<i>R. etli</i>	55.7	11	6	22	7	9/13	8.9	0.017	0.019	-0.50
Total	58.0	20	13	124	109	67/45	59.8	0.116	0.077	

Coeficiente de diferenciación= 0.881



**Tabla 3.-** Prueba de congruencia entre pares de genes (ILD). Se indica el valor de probabilidad (P) de que los pares de secuencias sean congruentes y entre paréntesis el número de secuencias analizadas, para **a) *R. gallicum***, **b) *R. etli*** y **c) *R. gallicum* y *R. etli* juntos**. NP significa que no fue posible el análisis debido al reducido número de secuencias. En negritas se indican los valores  $P > 0.05$ .

a) *R. gallicum*

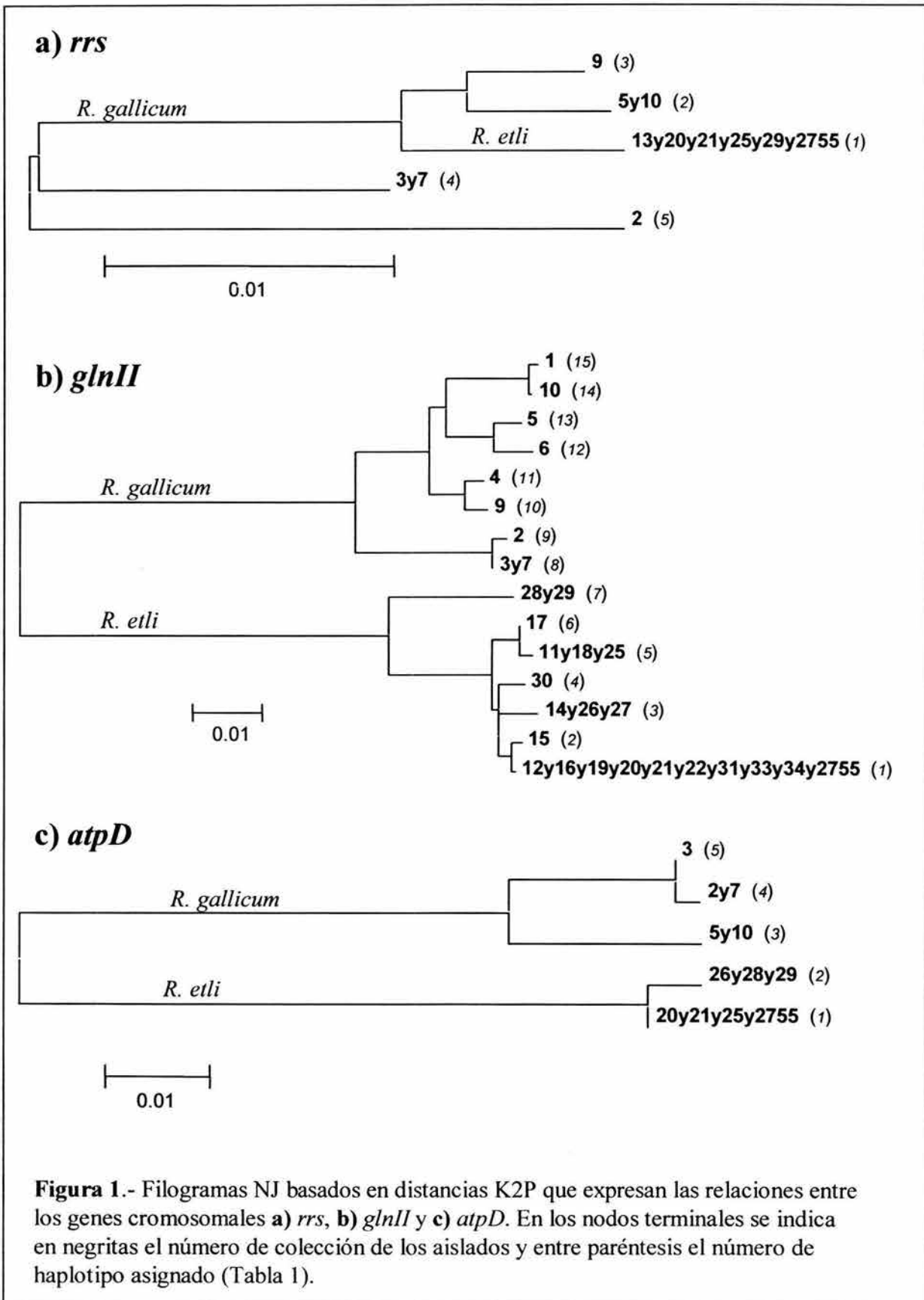
Secuencia	<i>glnII</i>	<i>atpD</i>	<i>nifH</i>	<i>nodB</i>
<i>rrs</i>	<b>1.000</b> (6)	0.070 ( <b>4</b> )	0.001 (6)	0.001 (6)
<i>glnII</i>		<b>1.000</b> (5)	0.001 (9)	0.001 (8)
<i>atpD</i>			0.001 (5)	0.052 ( <b>5</b> )
<i>nifH</i>				<b>1.000</b> (9)

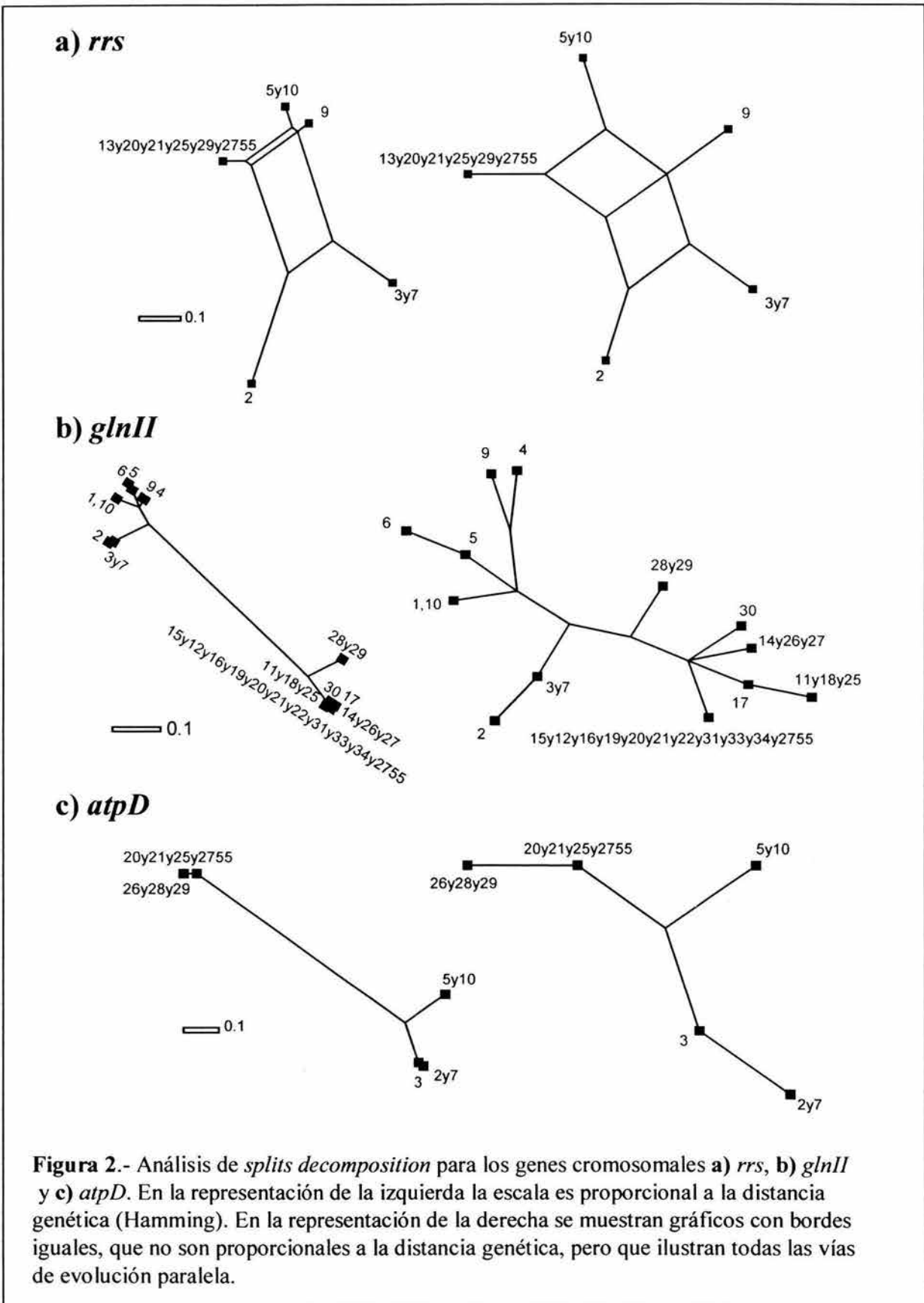
b) *R. etli*

Secuencia	<i>glnII</i>	<i>atpD</i>	<i>nifH</i>	<i>nodB</i>
<i>rrs</i>	NP (3)	<b>NP</b> ( <b>2</b> )	<b>1.000</b> (4)	NP (3)
<i>glnII</i>		<b>0.242</b> (4)	<b>0.076</b> (11)	0.006 (7)
<i>atpD</i>			<b>0.120</b> (6)	<b>NP</b> ( <b>3</b> )
<i>nifH</i>				<b>0.416</b> (6)
				<b>1.000</b> (5)

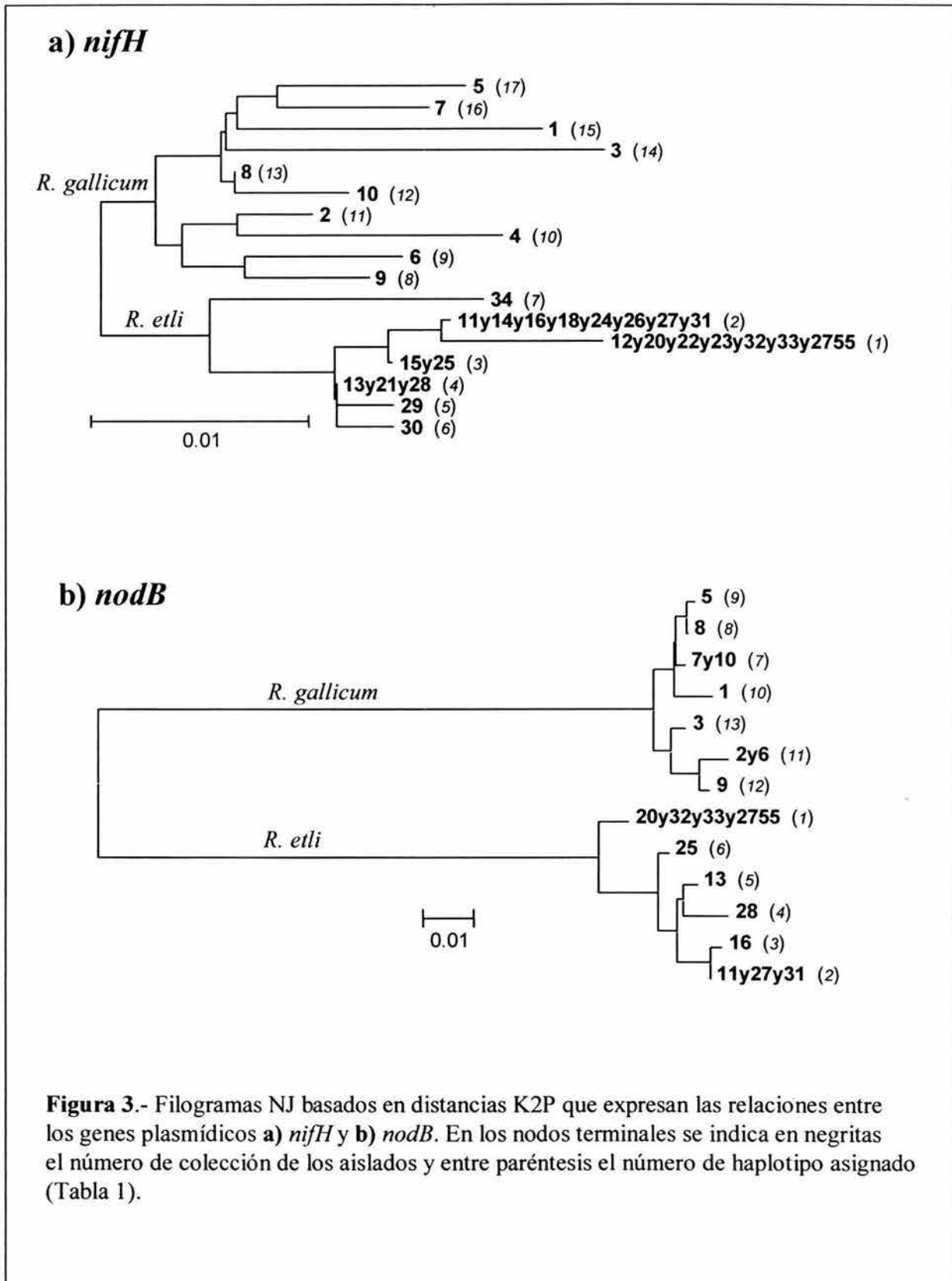
c) *R. gallicum* + *R. etli*

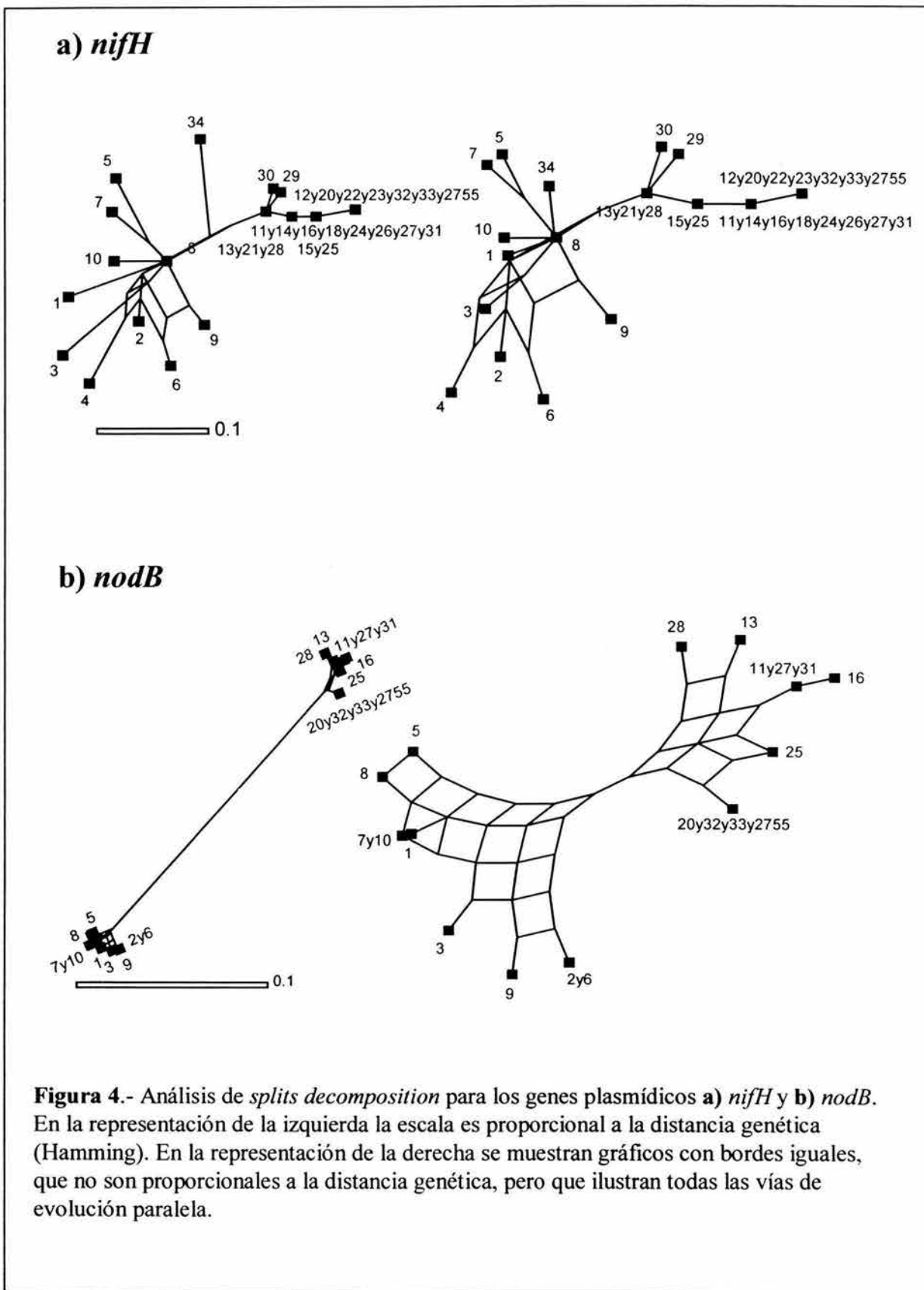
Secuencia	<i>glnII</i>	<i>atpD</i>	<i>nifH</i>	<i>nodB</i>
<i>rrs</i>	<b>0.190</b> (8)	<b>0.091</b> (10)	<b>0.147</b> (10)	0.001 (9)
<i>glnII</i>		0.007 (9)	0.001 (20)	0.001 (15)
		<b>1.000</b> (8)		
<i>atpD</i>			0.001 (11)	0.002 (8)
<i>nifH</i>				<b>0.536</b> (15)
				<b>1.000</b> (14)

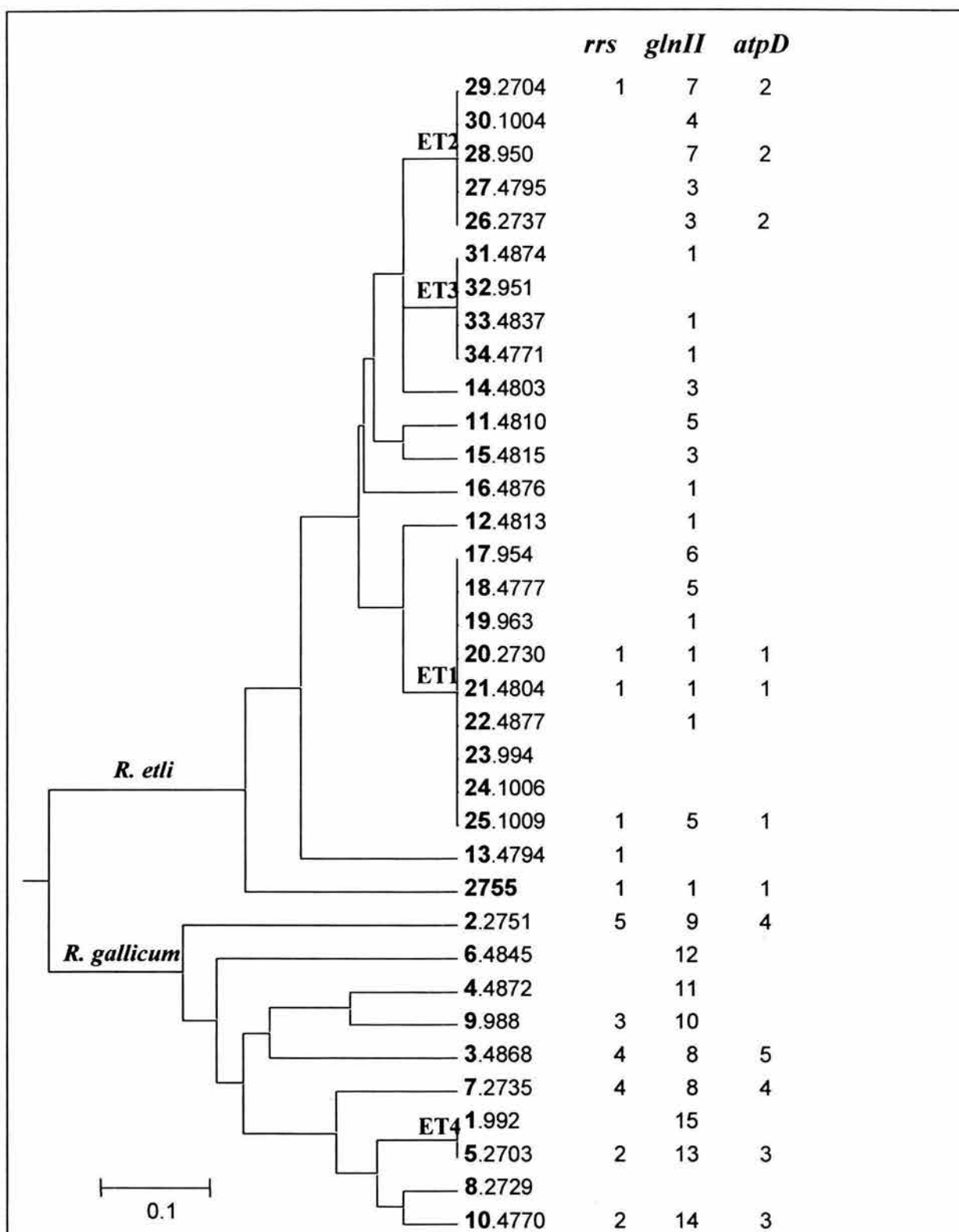




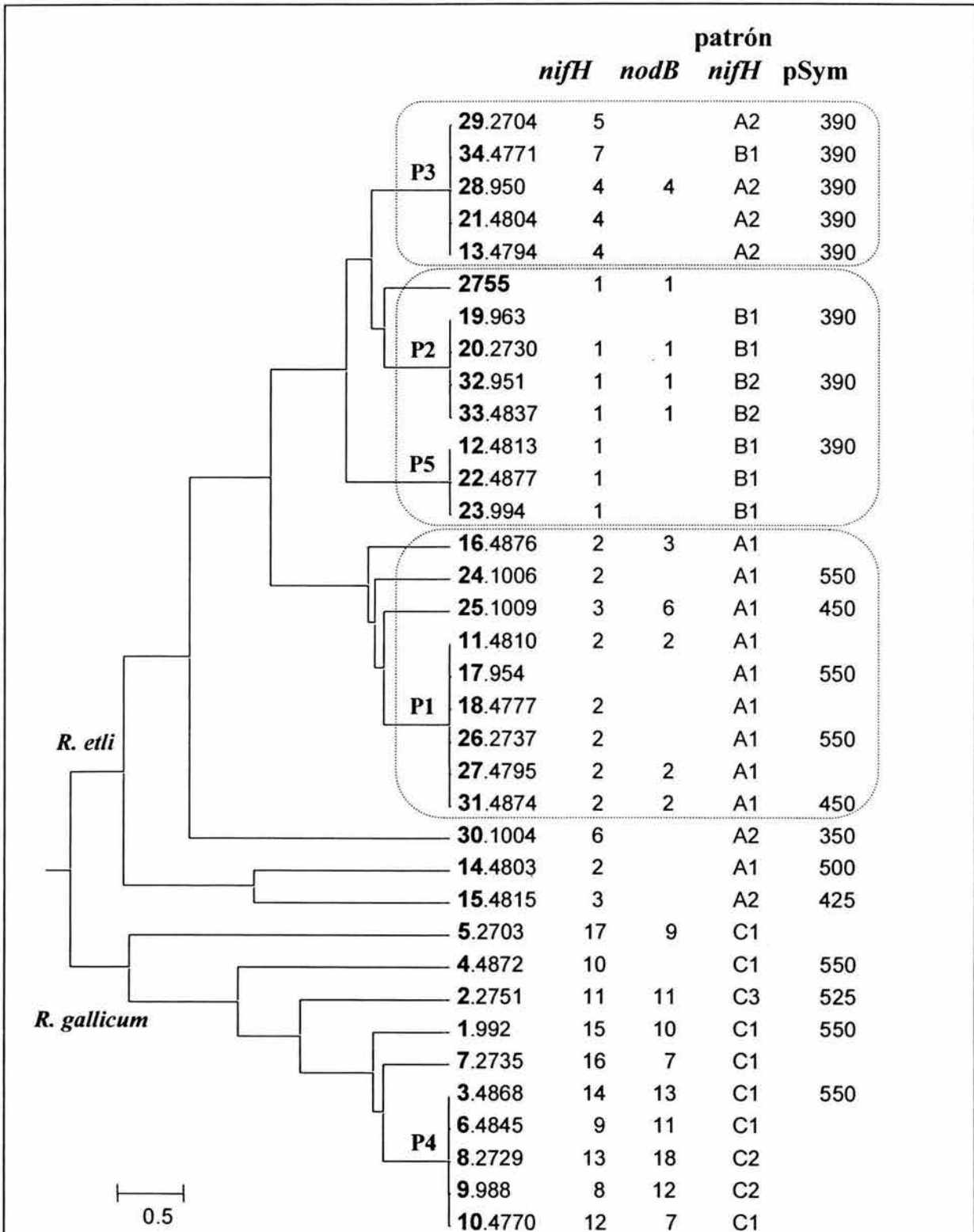
**Figura 2.-** Análisis de *splits decomposition* para los genes cromosomales a) *rrs*, b) *glnII* y c) *atpD*. En la representación de la izquierda la escala es proporcional a la distancia genética (Hamming). En la representación de la derecha se muestran gráficos con bordes iguales, que no son proporcionales a la distancia genética, pero que ilustran todas las vías de evolución paralela.



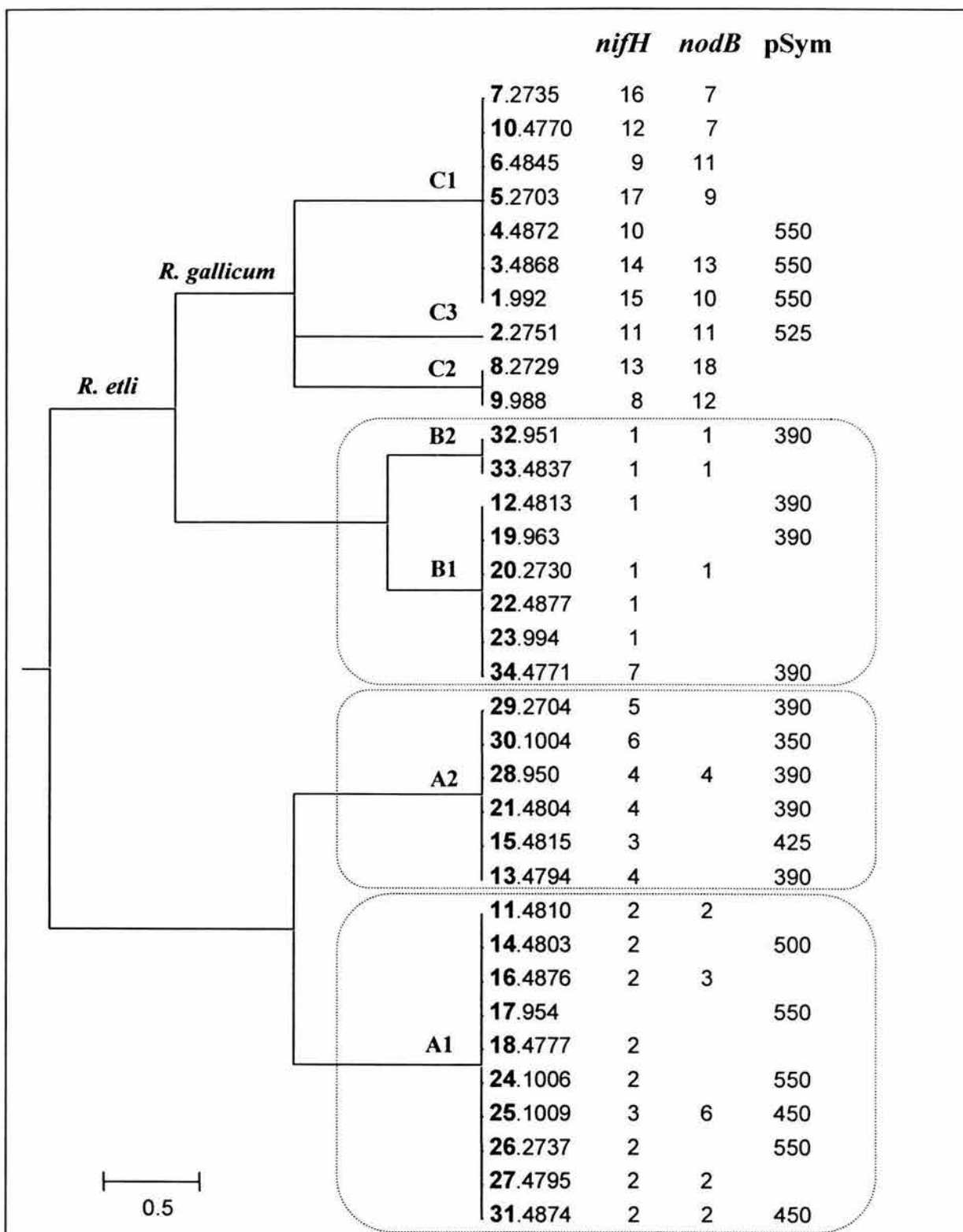




**Figura 5.-** Dendrograma UPGMA que muestra las relaciones entre los genotipos multilocus (ETs), y a la derecha se indican los haplotipos para los genes cromosomales *rrs*, *glnII* y *atpD* (Tabla 1).

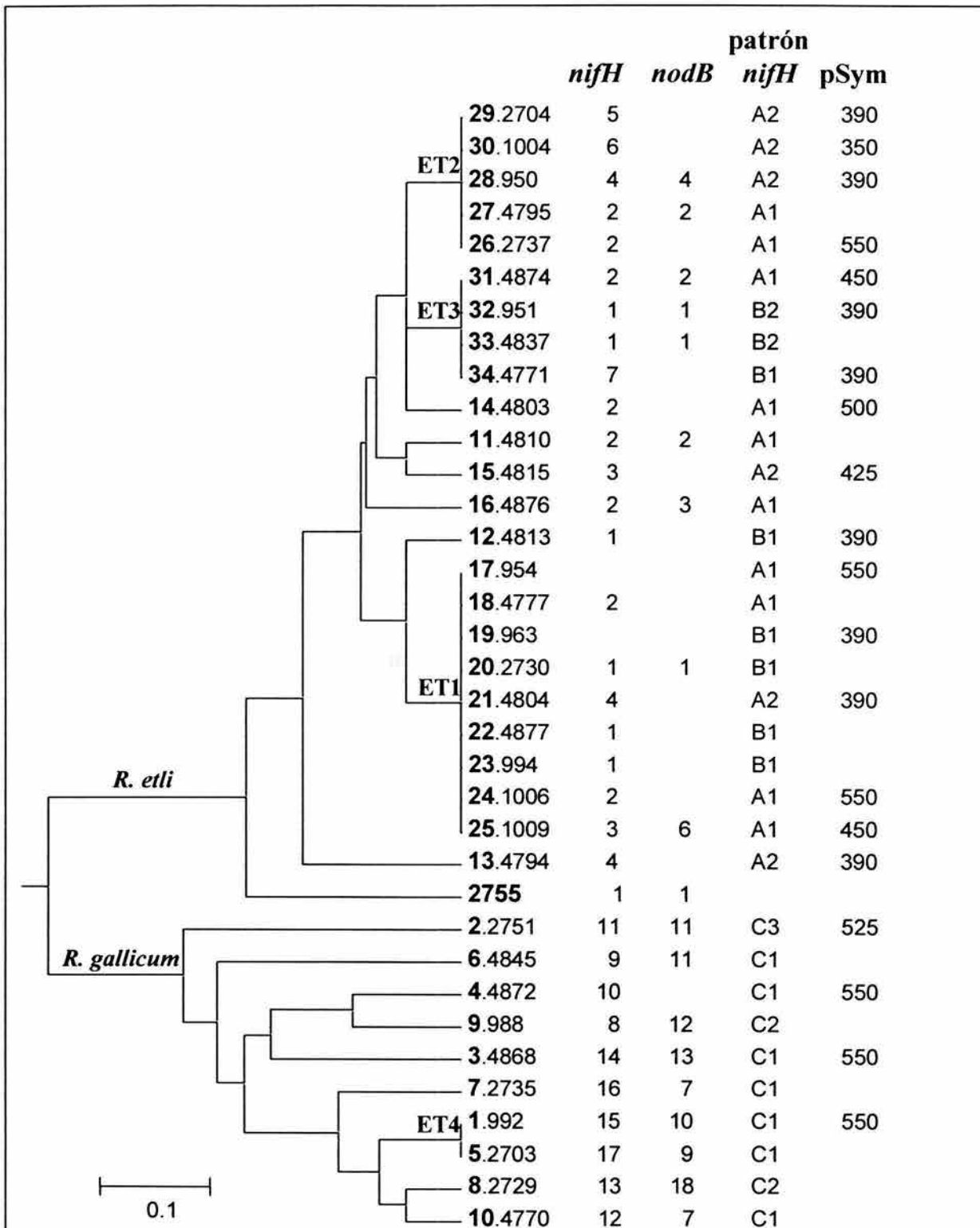


**Figura 6.-** Dendrograma UPGMA que muestra las relaciones entre los perfiles de plásmidos, y a la derecha se indican los haplotipos para los genes plasmídicos *nifH* y *nodB*, los patrones RFLP de *nifH* y el tamaño de los plásmidos simbióticos (Tabla 1 y Tabla 3 en Silva et al. (2003)).



**Figura 7.-** Dendrograma UPGMA que muestra las relaciones entre los patrones de RFLP de *nifH*, y a la derecha se indican los haplotipos para los genes plasmídicos *nifH* y *nodB*, y el tamaño de los plásmidos simbióticos (Tabla 1 y Tabla 3 en Silva et al. (2003)).





**Figura 8.-** Dendrograma UPGMA que muestra las relaciones entre los genotipos multilocus (ETs), y a la derecha se indican los haplotipos para los genes plasmídicos *nifH* y *nodB*, los patrones de RFLP de *nifH* y el tamaño de los plásmidos simbióticos (Tabla 1 y Tabla 3 en Silva et al. (2003)).

## CAPITULO IV.- ANALISIS FILOGENETICO A NIVEL MOLECULAR

### IV.1 Metodología

#### III.1.1 Reconstrucciones filogenéticas

Cada una de nuestras secuencias de los genes *rrs*, *glnII*, *atpD*, *nifH* y *nodB* se comparó con secuencias disponibles en el GenBank utilizando el programa de búsqueda BLAST. Las secuencias más cercanas y las de algunos grupos externos se alinearon con las nuestras utilizando el programa ClustalW implementado en Bioedit (Hall, 1999). El grado de saturación de la tercera posición de los codones se estimó utilizando el índice de Xia et al. (2002) implementado en DAMBE (Xia y Xie, 2001; Xia *et al.*, 2002). Para determinar el modelo de evolución nucleotídica más ajustado para cada gen, se utilizó la prueba jerárquica de razón de verosimilitud (hierarchical likelihood ratio test, HLRT) implementada en el programa Modeltest v.3.06 (Posada y Crandall, 1998). Este programa analiza jerárquicamente los valores de verosimilitud de 56 modelos de evolución de la familia *general time reversible* (GTR o REV). La prueba comienza con el modelo de evolución más sencillo (Jukes-Cantor) y va añadiendo parámetros que consideran heterogeneidades en frecuencias y tasas de sustitución nucleotídicas, como disparidad en frecuencias de nucleótidos ( $\pi$ ), proporción de sitios invariables (I) y variación en la tasa de sustitución entre sitios (G), hasta llegar al modelo más complejo y general (GTR+I+G). En cada paso se evalúa la razón de verosimilitud de un modelo dado con respecto a otro que incluye un parámetro adicional, hasta que la adición de más parámetros ya no aumenta la función de verosimilitud de modelos más complejos. La significancia de los valores de la razón de verosimilitud se evalúa mediante una prueba de ji-cuadrada (Posada y Crandall, 2001). De este modo se escogió el modelo más ajustado a las características evolutivas de cada matriz de datos. Las reconstrucciones filogenéticas para cada gen se realizaron con el método de agrupamiento neighbor-joining (NJ) y el modelo de sustitución recomendado por el HLRT, utilizando el programa PAUP\* (Swofford, 2002) con un bloque paup en el que se especificaron los parámetros del modelo seleccionado por el programa Modeltest. Se hicieron pruebas de soporte estadístico de ramas (análisis bootstrap (Felsenstein, 1985)) con 1,000 réplicas y los valores de bootstrap de cada nodo significativo del árbol consenso se agregaron al árbol de NJ.

Las reconstrucciones filogenéticas en base a aminoácidos se hicieron con la distancia corregida de Poisson (Nei y Kumar, 2000) y con 1,000 réplicas de bootstrap, utilizando el programa MEGA (Kumar, et al., 2001).

## IV.2 Resultados

En esta sección reanalizamos las secuencias del capítulo anterior en un contexto más amplio, comparándolas con las de otras especies de rizobios. A continuación desglosamos el análisis filogenético de cada uno de los genes secuenciados junto con las secuencias reportadas en las bases de datos o generadas por nosotros para cepas relacionadas con *R. etli* y *R. gallicum* (Tabla 1, Capítulo III). En el caso de los genes que codifican para proteínas, comparamos el producto de los genes de nuestras poblaciones con los de otros rizobios.

La prueba de saturación de Xia et al. (2003) reveló que no existe saturación significativa en las terceras posiciones de los 4 genes codificadores de proteínas, por lo que todas las posiciones de los codones fueron consideradas en las reconstrucciones filogenéticas.

Todas las filogenias basadas en secuencias de nucleótidos fueron reconstruidas usando el modelo de sustitución y valores de los parámetros de frecuencia y tasa más ajustados para cada alineamiento, los cuales fueron seleccionados mediante la prueba jerárquica de razones de verosimilitud (HLRT). Los valores de dichos parámetros se presentan en la Tabla 4. El análisis de HLRT mostró que en todos los alineamientos las frecuencias de nucleótidos y las tasas de sustitución son heterogéneas, razón por la cual los modelos más sencillos (Jukes-Cantor 1969, Felsenstein 1981 y Kimura 1980, que no consideran esta complejidad del patrón evolutivo) quedan descartados con una confianza estadística muy significativa ( $P \ll 0.001$ ) al ser comparados con modelos alternativos más complejos que consideran estas heterogeneidades. Los 5 alineamientos analizados presentan un contenido de G+C superior al de A+T, y presentan un sesgo significativo y de diferente intensidad en favor de sustituciones transicionales (Ti), dominando las de tipo [C-T] en todos los casos (Tabla 4). Asimismo, la incorporación de parámetros de corrección (I y G) para la variación entre sitios de las tasas de sustitución a lo largo de los alineamientos, consistentemente incrementó de manera altamente significativa ( $P \ll 0.001$ ) los valores de verosimilitud de las filogenias correspondientes con respecto a los modelos nulos más simples (Tabla 4). Este análisis muestra, en definitiva, que el patrón de sustitución en los alineamientos analizados es complejo, y que por consiguiente es necesario utilizar modelos de evolución avanzados para recuperar filogenias fidedignas (Posada y Crandall, 2001).

### IV.2.1 Relaciones filogenéticas del gen *rrs*

El alelo *rrs* de nuestra población de *R. etli* fue idéntico al de otro aislado de *R. etli* y diferente por sólo 2 nucleótidos del de la cepa tipo CFN42 (Fig. 9). El grupo formado por *R. etli* y *R. leguminosarum* está bien definido, sostenido por un nivel moderado pero significativo de bootstrap

(70%) y bien separado de otras especies, aunque la separación de los aislados de ambas especies dentro del grupo no es del todo clara. Esto se puede deber a que hasta 1993 *R. etli* era llamado *R. leguminosarum*, o a la transferencia lateral de este gen entre estas especies (Eardly, et al., 1995), o a que algunos aislados están mal clasificados. Así por ejemplo, dentro del grupo de *R. etli* se encuentra un aislado (USDA1877) clasificado como *R. mongolense* (van Berkum *et al.*, 1998).

Debido a la gran diversidad genética del gen *rrs* de nuestra población de *R. gallicum*, sus relaciones filogenéticas resultaron ser más complicadas e interesantes. Los alelos de los aislados 9, 5 y 10 se agruparon con otros aislados clasificados como *R. gallicum*, *R. mongolense* y *R. yanglingense* (Fig.9). El alelo del aislado 9 fue idéntico a los de dos aislados de *R. gallicum*, uno aislado de *Gliricidia sepium* en Puerto Rico (Zurdo-Pineiro *et al.*, No publicado), y otro aislado de *P. vulgaris* en Austria (Sessitsch *et al.*, 1997), y al de *R. yanglingense* aislado de *Coronilla varia* en China (Tan *et al.*, 2001) (Tabla 5). Es importante notar que dentro del grupo de *R. gallicum* se encuentran aislados clasificados recientemente como otras especies, *R. mongolense* y *R. yanglingense*. A diferencia de lo observado en el grupo de *R. etli* y *R. leguminosarum*, estas especies no se separan en grupos definidos, por lo que es difícil considerarlas como especies hermanas, más bien dan la impresión de pertenecer al mismo linaje y que su asignación específica no es clara, por lo que le llamaremos el grupo de *R. gallicum* (*sensu lato*) (Fig. 9 y Tabla 5).

El haplotipo compartido por los aislados 3 y 7 se encontró fuera del grupo de *R. gallicum* (Fig. 9). El análisis BLAST usando este haplotipo como sonda no encontró secuencias con alelos similares y las reconstrucciones filogenéticas lo relacionan lejanamente con el alelo reportado para *R. indigoferae*, especie aislada de *Indigofera* spp. en China (Wei *et al.*, 2002). El alelo del aislado 2 se encuentra relacionado con el grupo de *R. tropici-Agrobacterium*. (Fig. 9), lo cual podría indicar que este aislado adquirió este alelo por transferencia lateral del grupo de *R. tropici-Agrobacterium*.

Si tomáramos al gen *rrs* como criterio para separar a las especies bacterianas, llegaríamos a las siguientes conclusiones. Se confirma que nuestros aislados clasificados como *R. etli* sin lugar a dudas pertenecen a dicha especie. Propondríamos que las especies *R. gallicum*, *R. mongolense* y *R. yanglingense* pertenecen a una sola especie, *R. gallicum*, en la que se incluyen nuestros aislados 9, 5 y 10. Propondríamos que los aislados 3 y 7 pertenecen a una especie de *Rhizobium* nueva, aún no descrita, o a un linaje divergente de *R. indigoferae*. Y por último, que el aislado 2 pertenece a la especie *R. tropici*. Sin embargo, como se discutirá más adelante, y en base a los resultados del análisis de los demás genes secuenciados, algunas de estas conclusiones han de cuestionarse seriamente.

#### IV.2.2 Relaciones filogenéticas del gen *glnII* y la proteína GSII

Las reconstrucciones filogenéticas del gen *glnII* (Fig. 10) muestran que los alelos de los aislados de *R. etli* se encuentran cercanamente relacionados con el de la cepa tipo CFN42 y con el de *R. leguminosarum*, en concordancia con los resultados del gen *rrs*. Los alelos de los aislados de *R. gallicum* se agruparon con otros aislados de *R. gallicum* y con la cepa tipo de *R. mongolense*, sugiriendo que esta última pertenece al linaje de *R. gallicum*. A diferencia del agrupamiento generado con el gen *rrs*, en este caso el grupo de alelos de los aislados 2, 3 y 7 aparece como un grupo divergente dentro de *R. gallicum* y alejado de otras especies de *Rhizobium*, como *R. tropici* (Fig. 10).

La mayor parte de las mutaciones en *glnII* son sinónimas (Tabla 2b, Capítulo III), por tanto la variación genética del gen *glnII* no produjo cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Entre los alelos de la población de *R. gallicum* encontramos sólo 2 sustituciones no sinónimas y una dentro de la de *R. etli* (Tabla 2b, Capítulo III). Al comparar la reconstrucción filogenética basada en aminoácidos incluyendo grupos externos, vemos que la cepa CFN42 tiene una proteína idéntica a la de la mayoría de nuestros aislados de *R. etli* y que la cepa tipo de *R. mongolense* tiene una proteína idéntica a la de los aislados 2, 3 y 7 de *R. gallicum* (Fig. 14a). Estos resultados muestran que la variación genética observada en los aislados de *R. etli* y *R. gallicum*, provenientes de distintas localidades, e incluso continentes, es resultado de la acumulación de mutaciones neutrales que no se traducen en sustituciones de aminoácidos que afecten al fenotipo.

#### IV.2.3 Relaciones filogenéticas del gen *atpD* y la proteína AtpD

Las reconstrucciones filogenéticas basadas el gen *atpD* agruparon a los aislados de *R. etli* con una cepa de *R. leguminosarum*, mientras que la cepa tipo de *R. etli* CFN42 se encontró lejanamente relacionada a este grupo (Fig. 11), en contraste con lo encontrado para los genes *rrs* y *glnII*. Esto podría deberse simplemente a que la secuencia de la cepa CFN42 obtenida de la base de datos del GenBank estaba errónea, sin embargo, la volvimos a secuenciar y resultó ser idéntica a la reportada (Gaunt, et al., 2001). Este resultado podría indicar que alguna de las fuerzas evolutivas ha llevado por caminos diferentes a los alelos de la población de *R. etli* de San Miguel y el de la cepa CFN42, o que esta cepa adquirió por transferencia horizontal un segmento del alelo de otra especie, como *R. tropici*, ya que la mayoría de las sustituciones presentes en el *atpD* de ambas especies son coincidentes (Fig. 11).

Los alelos del gen *atpD* de los aislados de *R. gallicum* los agruparon con otras cepas de *R. gallicum* y con la cepa tipo de *R. mongolense* (Fig. 11), apoyando la hipótesis de la pertenencia de *R.*

*mongolense* al linaje de *R. gallicum*. En concordancia con los resultados del gen *glnII*, los aislados 2, 3 y 7 se muestran como un linaje dentro de *R. gallicum*, alejado de otras especies de *Rhizobium* (Fig. 11). Los resultados de los genes *glnII* y *atpD* (Fig. 10 y Fig. 11) apoyan la hipótesis de que el aislado 2 pertenece al linaje de *R. gallicum* y que adquirió un segmento de alelo *rrs* del linaje *R. tropici-Agrobacterium* (Fig. 9).

El análisis del gen *atpD* de la población de *R. etli* muestra que las 2 sustituciones encontradas son sinónimas, por lo que todas las proteínas fueron idénticas (Tabla 2c, Capítulo III). Entre las 16 sustituciones nucleotídicas de la población de *R. gallicum*, sólo una fue no sinónima (Tabla 2c, Capítulo III). La comparación con grupos externos muestra que la cepas R602sp y FL27 de *R. gallicum* tienen una proteína idéntica a una de las de nuestra población de *R. gallicum* y que difiere en un aminoácido de la de *R. mongolense* (Fig. 14b). El haplotipo *atpD* de los aislados 2, 3 y 7 codifica para una proteína idéntica, que difiere en un residuo de la de el resto de los aislados de *R. gallicum* (Fig. 14b). Estos resultados indican que aislados de *R. gallicum* de diversas localidades o continentes tienen subunidades de ATPasa altamente similares.

La proteína AtpD de la población de *R. etli* tuvo 2 aminoácidos de diferencia con la de *R. leguminosarum* y 3 con la de la cepa CFN42 (Fig. 14b). Esta última tiene a nivel nucleotídico un alelo muy divergente con respecto al de nuestra población de *R. etli*, sin embargo a nivel de aminoácidos esta diferencia es menor. Esto nos hace especular que esta cepa adquirió un segmento de un donador tipo *R. tropici*, pero que se han favoreciendo cambios que se ajustan al uso de codones y a la composición de aminoácidos de las proteínas de *R. etli*, mediante los proceso de amelioración y selección natural (Lawrence y Ochman, 1997).

#### IV.2.4 Relaciones filogenéticas del gen *nifH* y la proteína NifH

Las reconstrucciones filogenéticas del gen *nifH* muestran que la mayoría de los alelos de nuestra población de *R. etli* están muy cercanamente relacionados con los de otros aislados de *R. etli*, y que uno de los alelos abundantes (12-2755) es idéntico al de la cepa tipo CFN42 (Fig. 12). El aislado 34 de *R. etli* presentó un alelo divergente con respecto al resto y muy similar al de *R. etli* bv. *mimosae* (Wang, et al., 1999). Este resultado puede ser evidencia de la transferencia lateral del alelo *nifH* de la bv. *mimosae* a un aislado de la población de *R. etli* bv. *phaseoli*, como se discutirá más adelante.

Los alelos del gen *nifH* de nuestra población de *R. gallicum* se agruparon con otros aislados de *R. gallicum* (Fig. 12). Las reconstrucciones filogenéticas de este gen muestran a *R. etli* y *R. gallicum*

como grupos hermanos, separadas de las demás especies de *Rhizobium*. A diferencia de la historia evolutiva mostrada por los genes cromosomales, este gen plasmídico e involucrado en la simbiosis con la planta, muestra un ancestro común reciente entre ambas especies.

La mayoría de las sustituciones del gen *nifH* fueron sinónimas, sólo hubieron 2 sustituciones no sinónimas dentro de la población de *R. gallicum* y una en la población de *R. etli* (Tabla 2d, Capítulo III). A diferencia de lo encontrado para los genes cromosomales, la proteína producida por alelos divergentes de ambas especies es idéntica en la mayoría de los casos (solamente el aislado 29 de *R. etli* y los aislados 3, 4 y 5 de *R. gallicum* tuvieron un cambio, Fig. 15a). Asimismo, las proteínas de las biovariedades *phaseoli* y *mimosae* de *R. etli* producen proteínas idénticas (Fig. 15a). El análisis del gen *nifH* refleja las fuertes restricciones evolutivas que tiene esta proteína, por lo que la variabilidad genética observada dentro y entre *R. etli* y *R. gallicum* es resultado de la divergencia neutral acumulada en este gen.

#### IV.2.5 Relaciones filogenéticas del gen *nodB* y la proteína NodB

Las reconstrucciones filogenéticas de *nodB* ubicaron a las secuencias de *R. etli* en un grupo sustentado por altos valores de bootstrap (100%), y muestran que el alelo *nodB* más abundante fue idéntico al de la cepa tipo de *R. etli* CFN42 (Fig. 13). Los alelos *nodB* de nuestra población de *R. gallicum* se agruparon con otros aislados de *R. gallicum* de referencia, mostrando que el alelo de la cepa tipo R602sp es idéntico al de nuestros aislados 2 y 6 (Fig. 13). Al igual que el gen *nifH*, y en contraste con los genes cromosomales, *nodB* muestra como grupos hermanos a *R. etli* y *R. gallicum*. En contraste con los genes cromosomales, el alelo *nodB* de *R. mongolense* no se ubicó con los de *R. gallicum*, sino que se encontró relacionado con los alelos de *S. meliloti* (Fig. 13). Este resultado sugiere que cromosomalmente *R. mongolense* es un linaje de *R. gallicum* pero que sus genes simbióticos tiene un ancestro común con los de *S. meliloti*. Laguerre et al. (2001) encontraron que, aunque *R. gallicum* y *R. mongolense* tienen alelos *rrs* similares, el gen *nodC* de *R. mongolense* es del tipo de los rizobios que nodulan *Medicago* spp. Estos resultados apoyan la hipótesis de que *R. mongolense* es un linaje de *R. gallicum* que tiene genes simbióticos relacionados con los de otras especies de rizobios que nodulan *Medicago* spp., por lo que se le podría considerar como una biovariedad dentro de *R. gallicum*.

El análisis de la proteína NodB muestra aunque *R. etli* y *R. gallicum* están relacionados, existe un alto grado de divergencia entre ellos, así como entre los demás rizobios incluidos (Fig. 15b). Este gen es el único en el que las secuencias de *R. etli* fueron más diversas que las de *R. gallicum* y con

una gran cantidad de sustituciones no-sinónimas (Tabla 2e, Capítulo III). Como era de esperarse, la proteína NodB de *R. mongolense* está distantemente relacionada con las de *R. gallicum* y cercanamente con la de *S. meliloti* (Fig. 15b).

### IV.3 Discusión

Los resultados de los análisis filogenéticos coincidieron en gran medida con los resultados derivados de los análisis poblacionales y permitieron ubicar en un contexto más amplio a las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum* de San Miguel.

La aproximación filogenética aplicada a los datos de secuencias mostró la pertenencia de nuestras poblaciones clasificadas como *R. etli* y *R. gallicum* a los grupos monofiléticos conformados por individuos de esas especies reconocidas. Este resultado indica que aislados de estas especies de diferentes regiones están compartiendo un mismo acervo genético cromosomal y plasmídico, ya sea por herencia vertical o por transferencia horizontal. Las únicas excepciones fueron algunos alelos *rrs* de la población de *R. gallicum* y el alelo *atpD* de la cepa CFN42. En ambos casos la evidencia indica que eventos de transferencia lateral pueden estar involucrados en estas discordancias. El resto de los marcadores genéticos son congruentes con los conceptos de especie filogenéticos y basados en similitud. Bajo el concepto evolutivo de especie podemos reconocer que la transferencia lateral es inherente a la evolución de las especies bacterianas, por lo que el hecho de que el aislado 2 y la cepa CFN42 tengan alelos *rrs* y *atpD* parecidos a *R. tropici* no invalida su pertenencia a *R. gallicum* y *R. etli*, respectivamente. El alelo *rrs* de los aislados 3 y 7 parecen también tener su origen evolutivo en algún evento de recombinación, sin embargo en este caso no fue posible detectar al donador. Los *loci* de rRNA se consideran poco sujetos a eventos de transferencia lateral, sin embargo, existen varios reportes sobre transferencia lateral de segmentos de los genes *rrs* y *rrl* en bacterias y en particular en rizobios (ver Introducción general). Al parecer la gran diversidad de este *loci* en la población de *R. gallicum* de San Miguel se debe a que está sujeto a eventos de transferencia lateral y recombinación con otras especies del grupo *Rhizobium-Agrobacterium*.

El análisis de las secuencias de los genes *rrs*, *glnII* y *atpD* muestran que la cepa tipo de *R. mongolense* es parte de los linajes monofiléticos que componen a *R. gallicum*, y el análisis de la secuencia del gen *nodB* mostró que los genes simbióticos son del tipo de *S. meliloti*. Laguerre et al. (2001) ya habían descubierto que, aunque la cepa tipo de *R. mongolense* USDA1844 tiene un alelo *rrs* muy similar a *R. gallicum*, el análisis del gen *nodC* muestra que este gen simbiótico es similar al de *S. meliloti*. La filogenia basada en el gen *rrs* indica que, además de *R. mongolense*, *R.*



*yanglingense* también podrían pertenecer al linaje de *R. gallicum*. Dentro de este grupo la primer especie descrita fue *R. gallicum*, aislada de *P. vulgaris* (Amarger, et al., 1997), después fueron descritas *R. mongolense* aislada de *Medicago ruthenica* (van Berkum, et al., 1998) y *R. yanglingense* aislada de *Coronilla varia*, *Gueldenstaedtia multiflora* y *Amphicarpea trisperma* (Tan, et al., 2001). En las descripciones de estas especies se reconoce que sus alelos *rrs* tienen un nivel de similitud mayor a 97%, por lo que su separación como especies se basó principalmente en niveles de hibridación DNA:DNA menores a 70% entre cepas tipo. Sin embargo, debido a que en los rizobios el compartimiento plasmídico puede constituir alrededor del 50% del genoma (García de los Santos *et al.*, 1996; Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996), y que algunos plásmidos están en multicopia, en rizobios las hibridaciones DNA:DNA pueden subestimar los niveles de homología del compartimiento cromosomal. En los rizobios la ganancia y pérdida de plásmidos es frecuente, por lo que esta técnica tiene poco valor filogenético. En este grupo de bacterias la pérdida o ganancia de plásmidos simbióticos puede afectar drásticamente el fenotipo simbiótico, por lo que este carácter ecológico se ha utilizado para nombrar biovariedades dentro de las especies. En este sentido, a *R. gallicum* se le han descrito dos biovariedades (Amarger, et al., 1997). La biovar *gallicum*, se ha encontrado nodulando *P. vulgaris* en Francia, España, Austria y Túnez (Amarger, et al., 1997; Herrera-Cervera *et al.*, 1999; Mhamdi *et al.*, 2002; Sessitsch, et al., 1997), *Oxytropis riparia* y *Onobrychis viciifolia* en Canadá (Laguerre *et al.*, 1997) y *Gliricidia sepium* en Puerto Rico (Zurdo-Pineiro, et al., No publicado). La biovar *phaseoli* se ha aislado solamente de nódulos de frijol en Francia y España (Amarger, et al., 1997; Herrera-Cervera, et al., 1999). Nuestros análisis filogenéticos muestran que la cepa tipo de *R. mongolense* (van Berkum, et al., 1998) pertenece al linaje de *R. gallicum* y que su biovar es del tipo de *S. meliloti*. Nuestra propuesta es que *R. mongolense* debe reclasificarse en la especie *R. gallicum* (ya que ésta fue descrita antes que *R. mongolense*) y que debe asignársele una biovariedad que refleje su condición de ecotipo nodulador de *Medicago*; ésta bien podría ser *meliloti* o *medicae* haciendo referencia al hospedero (nicho) que ocupa, o bien *mongolense* para mantener su historia taxonómica. La filogenia derivada del gen *rrs* sugiere que el grupo formado por *R. gallicum*, *R. mongolense* y *R. yanglingense* podría considerarse como una misma especie con ecotipos o biovariedades asociados a un gran número de leguminosas. Para apoyar esta agrupación sería necesario analizar más genes cromosomales de varios aislados de estas especies, así como sus genes simbióticos, y realizar ensayos de rango de hospedero. Ello aportaría la información necesaria para asignarles una biovariedad. Por el momento sugerimos que estos aislados se reclasifiquen como *R. gallicum* con biovariedades *mongolense* y *yanglingense*. En

---

base a su amplia distribución geográfica y su gran diversidad genética y ecológica proponemos que *R. gallicum* (*sensu lato*) es una especie con un gran amplitud ecológica y extensa historia evolutiva. Al parecer esta especie tiene una historia evolutiva y simbiótica antigua de adaptación a diferentes ambientes y hospederos, ésta última probablemente a través de la adquisición de información simbiótica de otras especies de rizobios. El caso de *R. gallicum* nos parece un buen ejemplo de cómo una especie cosmopolita puede tener una gran variedad de ecotipos o biovariedades en distintos ecosistemas y localidades geográficas.

**Tabla 4.-** Parámetros nucleotídicos estimados en base al modelo seleccionado por la prueba jerárquica de razones de verosimilitud (HLRT). Se indican el número de secuencias, las frecuencias de nucleótidos, la matriz de tasas de sustitución, la proporción de sitios invariantes, el parámetro *alfa* de la distribución *gamma* y el modelo utilizado.

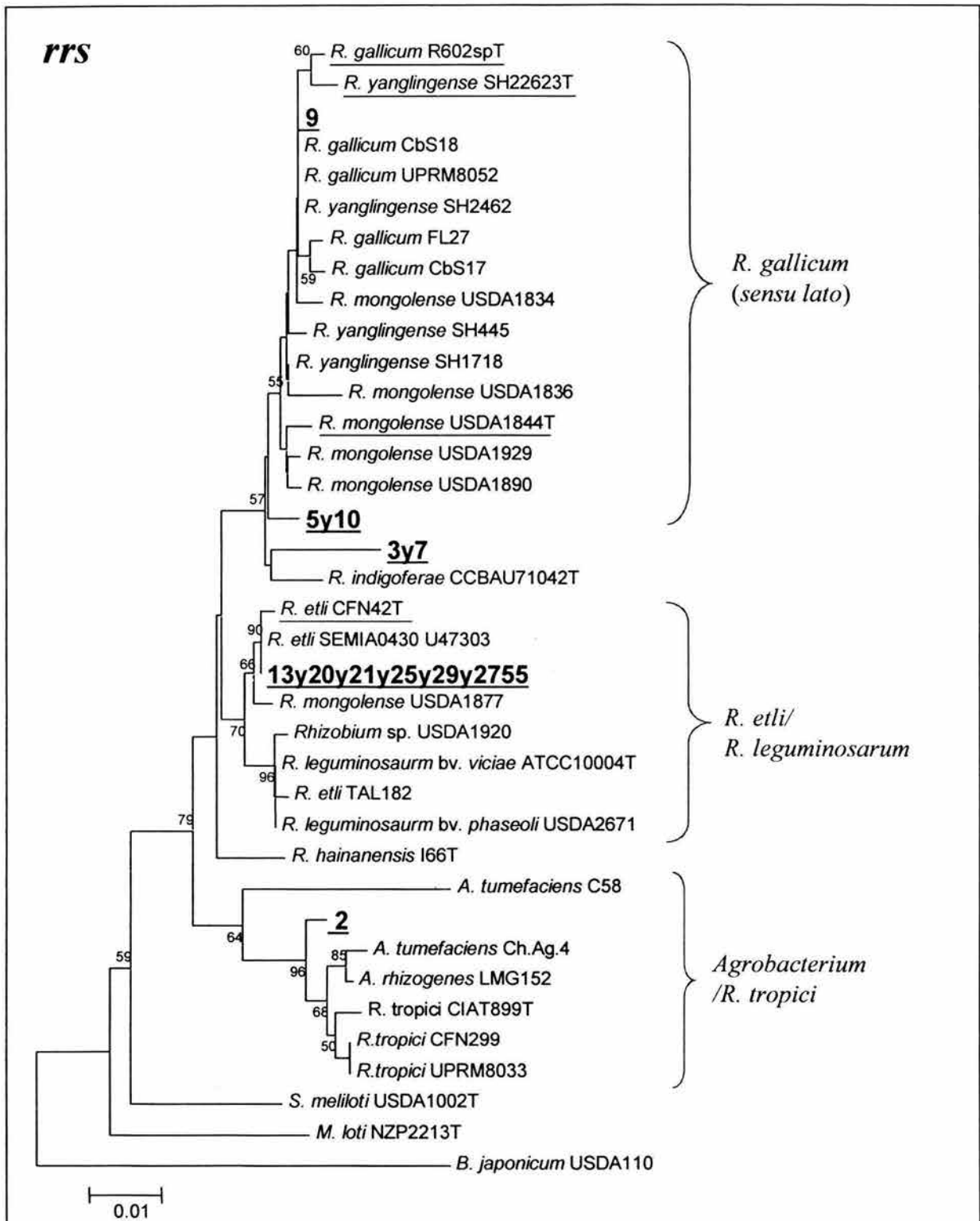
<i>Loci</i>	No. secs	G, C		Matriz de tasas de sustitución <sup>1</sup>	I	G	Modelo <sup>2</sup>
		A, T					
<i>rrs</i>	37	0.32, 0.23,	0.23, 0.22	<i>[A-G]=2.13; [C-T]=4.64</i> <i>[A-C]=1.00; [C-G]=2.14</i> <i>[A-T]=2.14; [G-T]=1.00</i>	0.54	0.34	TIM+I+G
<i>glnII</i>	27	0.29, 0.36	0.19, 0.16	<i>[A-G]=6.58; [C-T]=19.24</i> <i>[A-C]=1.70; [C-G]=4.31</i> <i>[A-T]=4.90; [G-T]=1.00</i>	0.52	1.97	GTR+I+G
<i>atpD</i>	17	0.31, 0.34	0.19, 0.16	<i>[A-G]=1.44; [C-T]=4.32</i> <i>[A-C]=0.36; [C-G]=1.05</i> <i>[A-T]=0.81; [G-T]=1.00</i>	0	0.25	GTR+G
<i>nifH</i>	26	0.30, 0.31	0.22, 0.17	<i>[A-G]=3.05; [C-T]=5.87</i> <i>[A-C]=1.00; [C-G]=1.00</i> <i>[A-T]=1.00; [G-T]=1.00</i>	0	0.30	TrN+G
<i>nodB</i>	19	0.29, 0.29	0.21, 0.21	razón de Ti/Tv= 1.66	0.22	1.75	HKY+I+G

<sup>1</sup> Las tasas de sustitución transicionales se indican en cursivas.

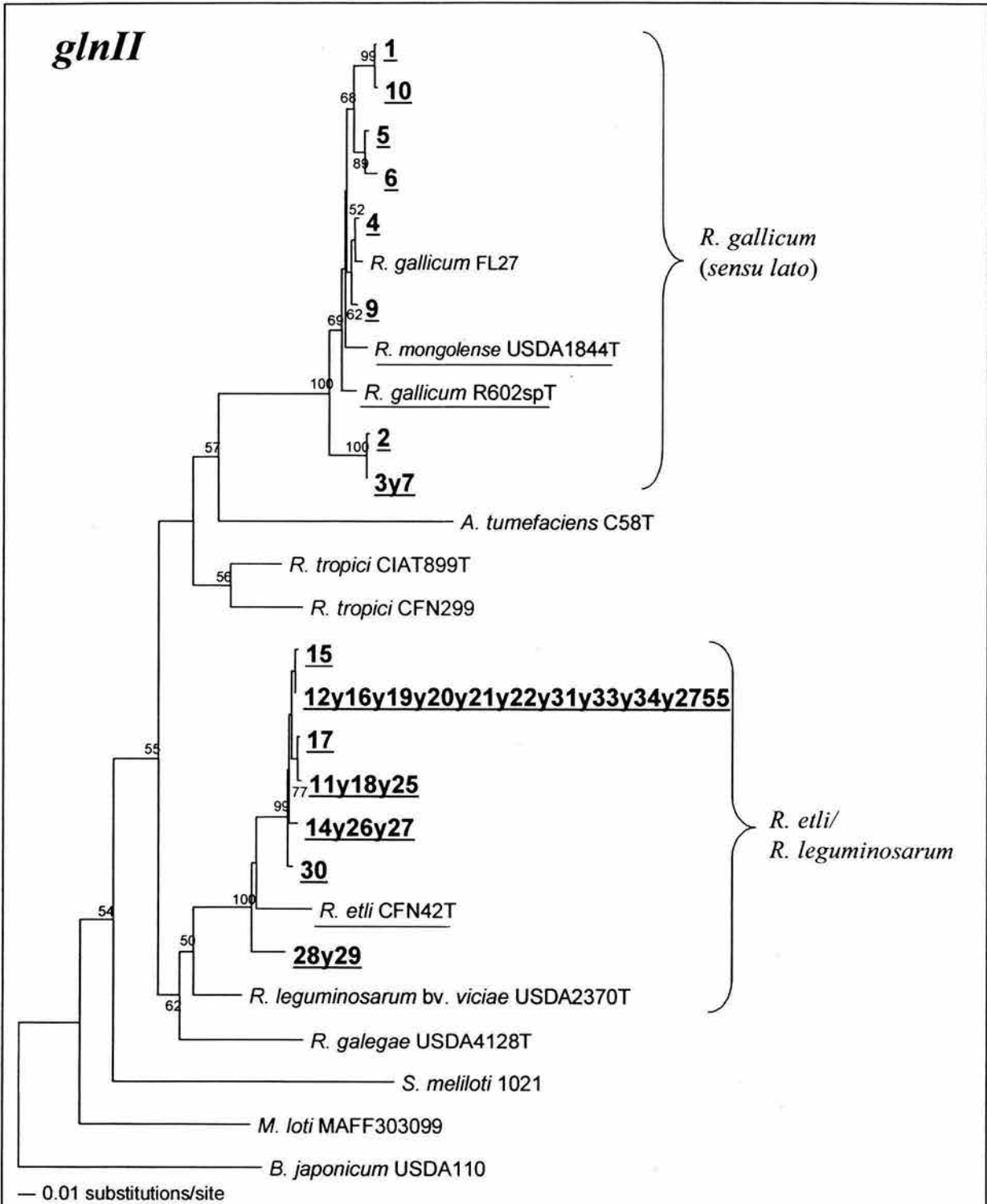
<sup>2</sup> GTR, *general time reversible* (Rodríguez *et al.*, 1990); TrN, Tamura-Nei (Tajima, 1993); TIM, Tamura-Nei con 4 parámetros (Posada y Crandall, 2001); HKY, Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985); I, proporción de sitios invariantes; G, parámetro *alfa*.

**Tabla 5.-** Descripción de los aislados del grupo de *R. gallicum* (*sensu lato*) incluidos en la filogenia *rrs* presentada en la Figura 9.

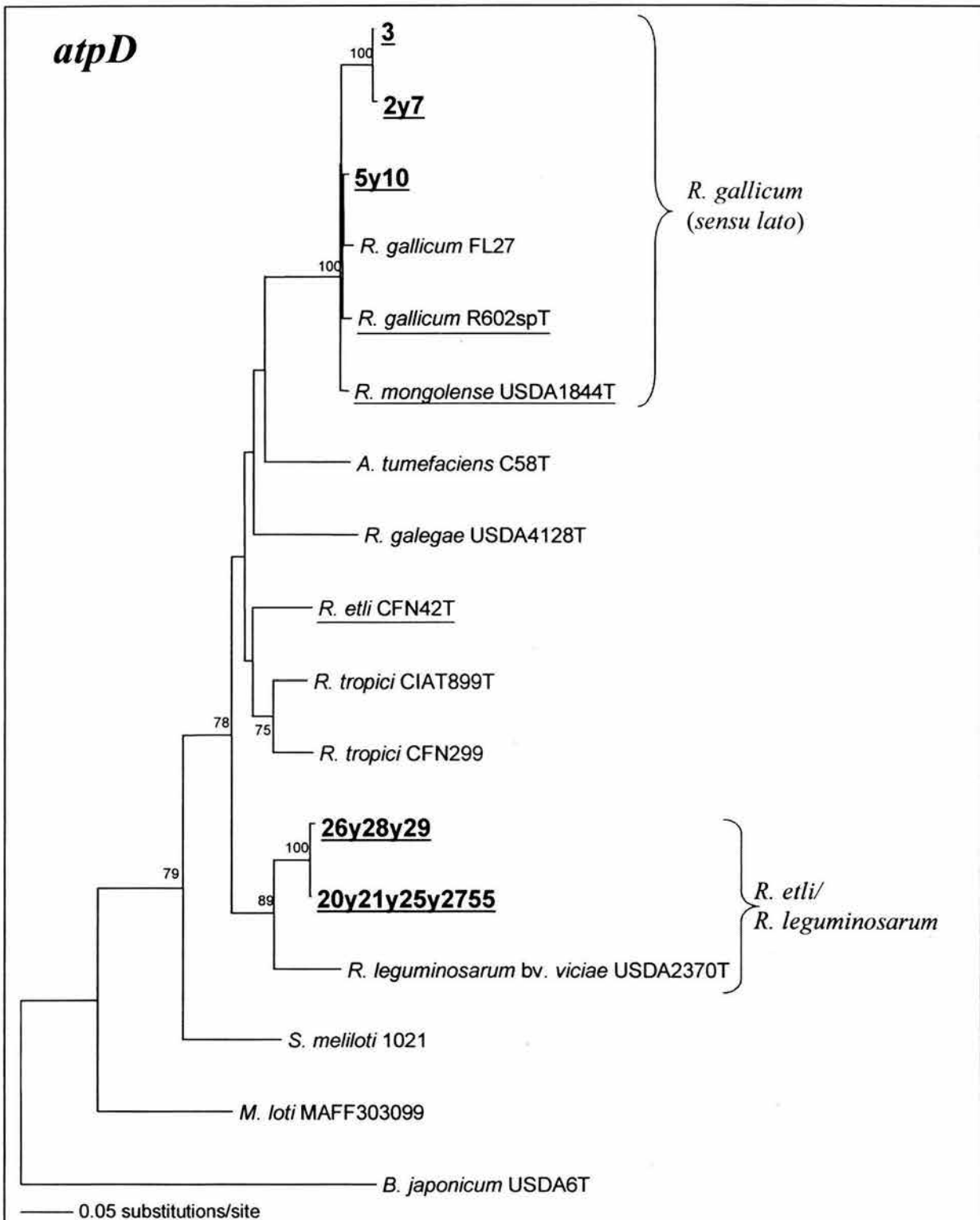
Especie	Aislado	País	Hospedero	Referencia
<i>R. gallicum</i>	R602spT	Francia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Amarger, et al., 1997)
<i>R. yanglingense</i>	SH22623T	China	<i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	(Tan, et al., 2001)
<i>R. gallicum</i>	CbS18	Austria	<i>P. vulgaris</i>	(Sessitsch, et al., 1997)
<i>R. gallicum</i>	IE988	México	<i>P. vulgaris</i>	Este trabajo
<i>R. gallicum</i>	UPMR8052	Puerto Rico	<i>Gliricidia sepium</i>	(Zurdo-Pineiro, et al., No publicado)
<i>R. yanglingense</i>	SH2462	China	<i>Coronilla varia</i>	(Tan, et al., 2001)
<i>R. gallicum</i>	FL27	Mexico	<i>P. vulgaris</i>	(Piñero <i>et al.</i> , 1988)
<i>R. gallicum</i>	CbS17	Austria	<i>P. vulgaris</i>	(Sessitsch, et al., 1997)
<i>R. mongolense</i>	USDA1834	Mongolia	<i>Medicago ruthenica</i>	(van Berkum, et al., 1998)
<i>R. yanglingense</i>	SH445	China	<i>C. varia</i>	(Tan, et al., 2001)
<i>R. yanglingense</i>	SH1718	China	<i>C. varia</i>	(Tan, et al., 2001)
<i>R. mongolense</i>	USDA1844T	Mongolia	<i>M. ruthenica</i>	(van Berkum, et al., 1998)
<i>R. mongolense</i>	USDA1929	Mongolia	<i>M. ruthenica</i>	(van Berkum, et al., 1998)
<i>R. mongolense</i>	USDA1890	Mongolia	<i>M. ruthenica</i>	(van Berkum, et al., 1998)
<i>R. gallicum</i>	IE2703	México	<i>P. vulgaris</i>	Este trabajo
<i>R. gallicum</i>	IE4770	México	<i>P. vulgaris</i>	Este trabajo



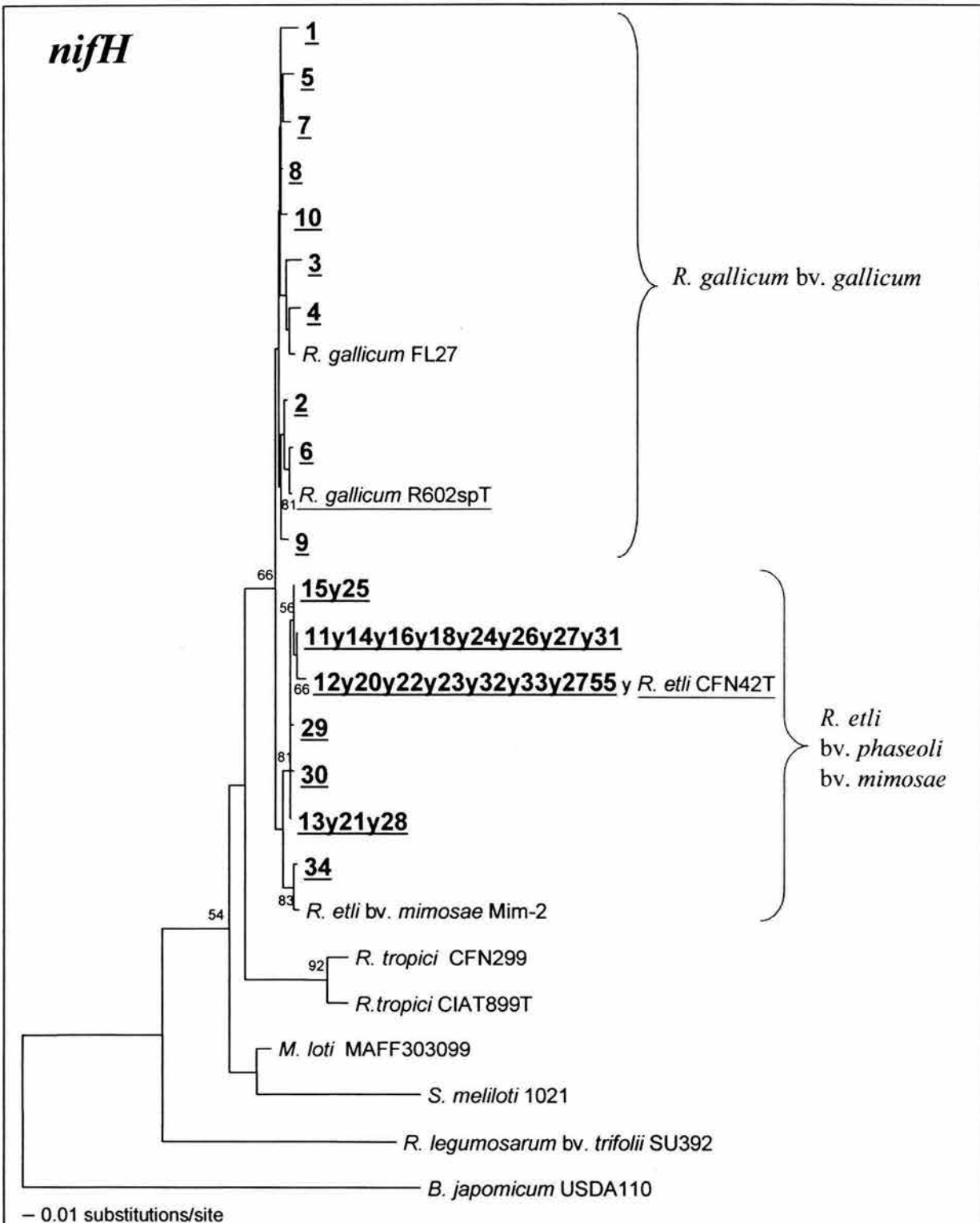
**Figura 9.-** Filogenia NJ del gen *rrs* en base al modelo TIM+I+G. Los aislados de San Miguel se muestran en negritas y para las secuencias obtenidas del GenBank se indica el número de accesoión. Las cepas tipo se indican con una T. En los nodos se indican los valores de bootstrap significativos (>50%) .



**Figura 10.-** Filogenia NJ del gen *glnII* en base al modelo GTR+I+G. Los aislados de San Miguel se muestran en negritas y para las secuencias obtenidas del GenBank se indica el número de accesión. Las cepas tipo se indican con una T. En los nodos se indican los valores de bootstrap significativos (>50%).

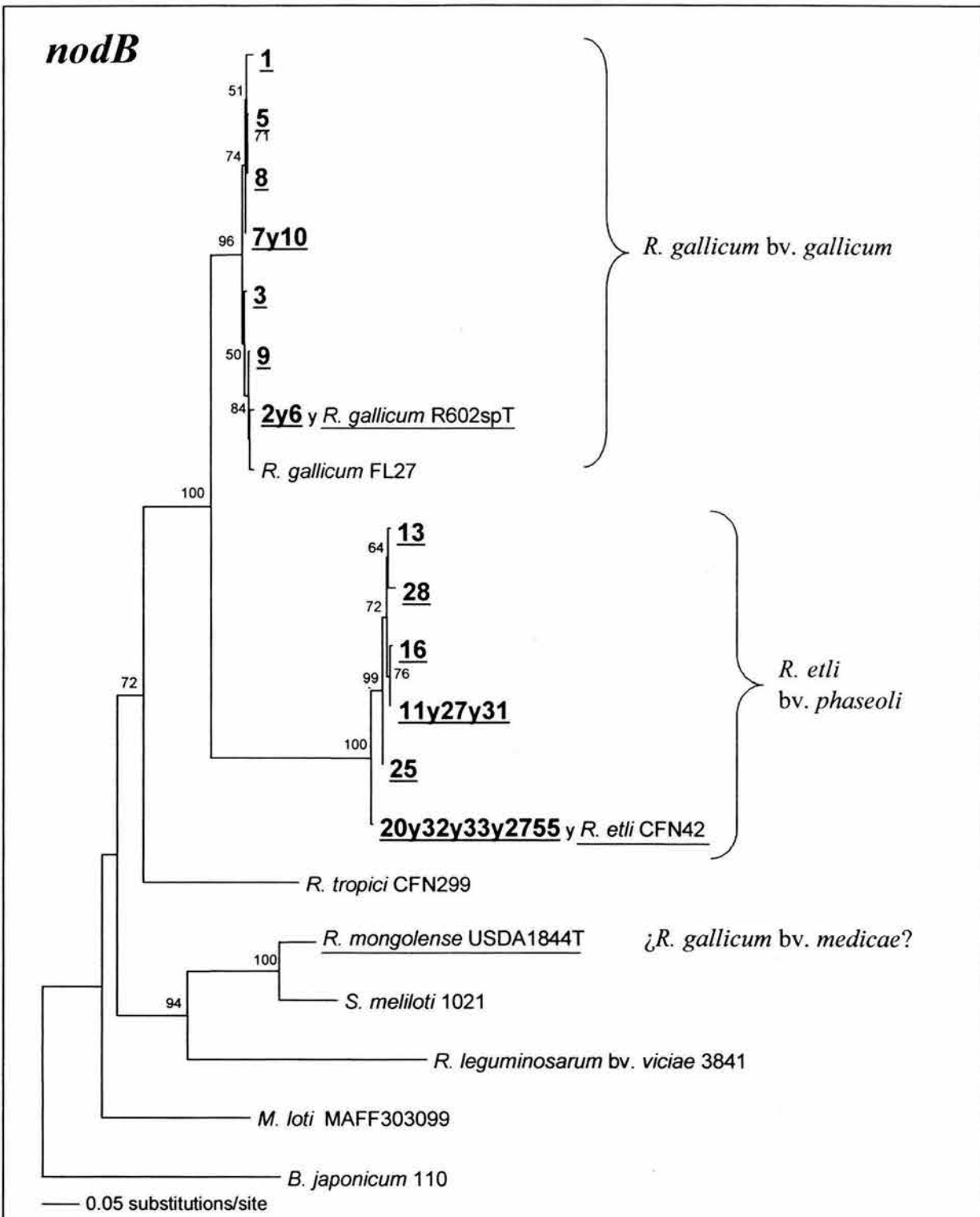


**Figura 11.-** Filogenia NJ del gen *atpD* en base al modelo GTR+G. Los aislados de San Miguel se muestran en negritas y para las secuencias obtenidas del GenBank se indica el número de accesión. Las cepas tipo se indican con una T. En los nodos se indican los valores de bootstrap significativos (>50%) .

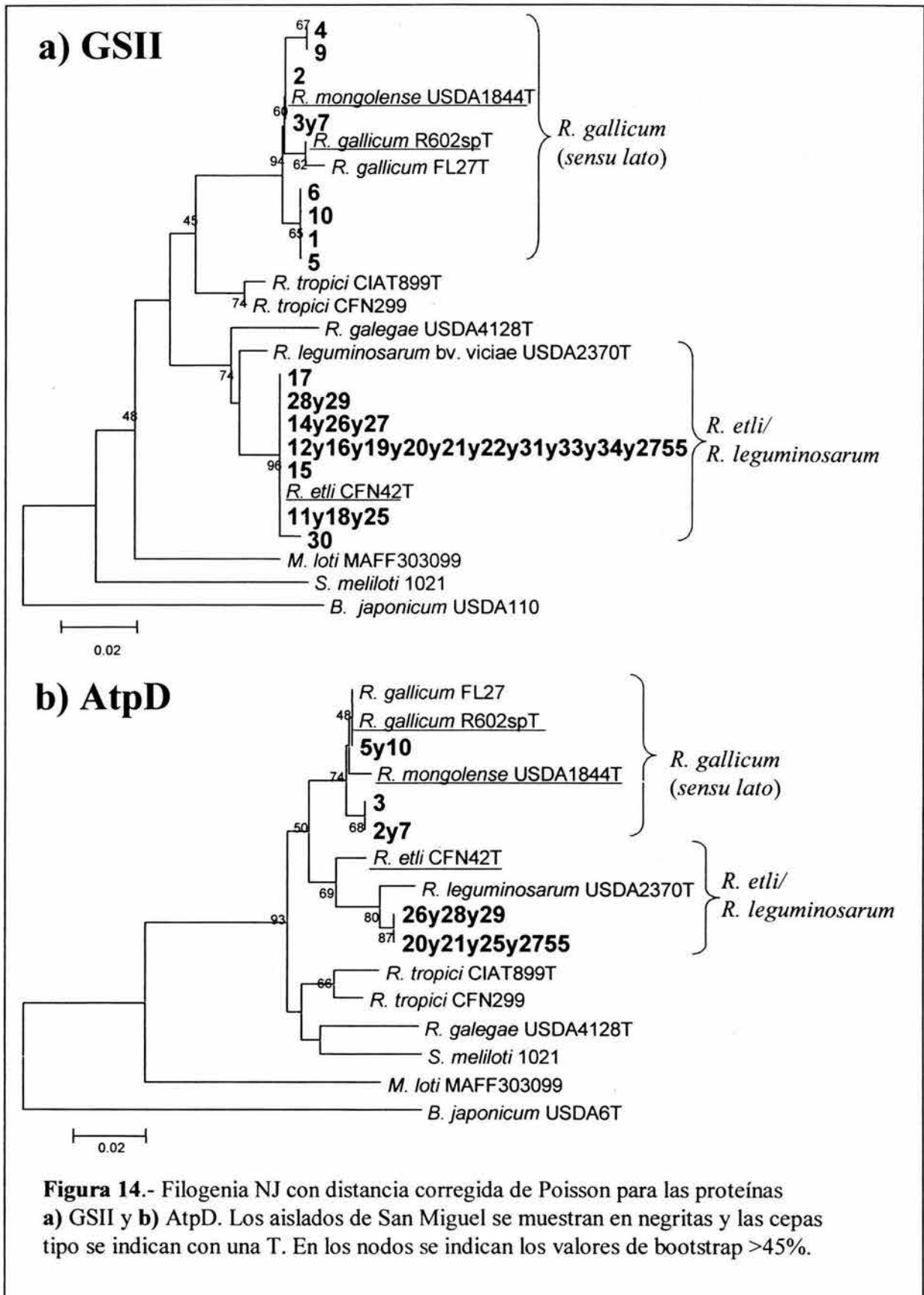


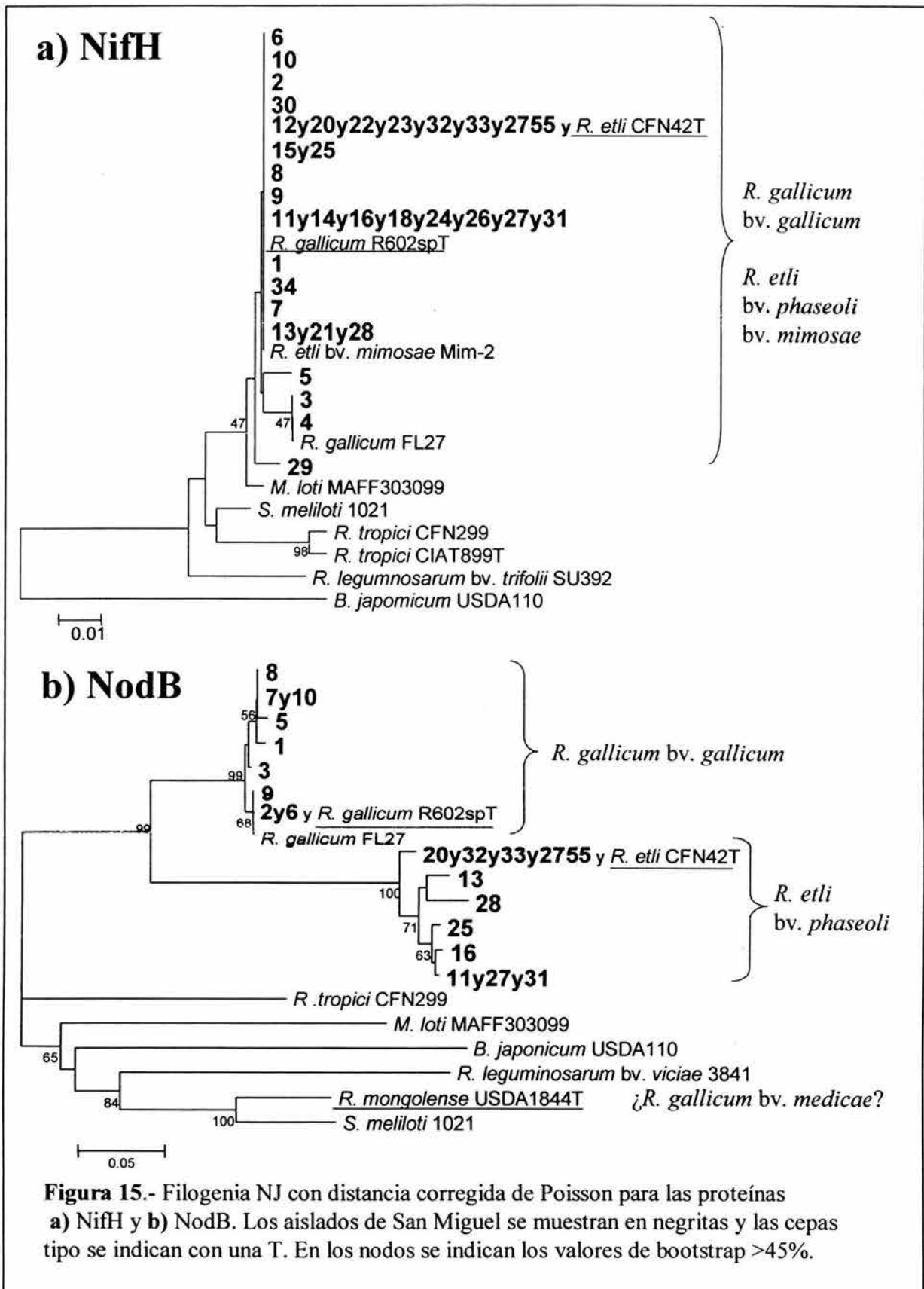
**Figura 12.-** Filogenia NJ del gen *nifH* en base al modelo TrN+G. Los aislados de San Miguel se muestran en negritas y para las secuencias obtenidas del GenBank se indica el número de accesión. Las cepas tipo se indican con una T. En los nodos se indican los valores de bootstrap significativos (>50%) .





**Figura 13.-** Filogenia NJ del gen *nodB* en base al modelo HKY+I+G. Los aislados de San Miguel se muestran en negritas y para las secuencias obtenidas del GenBank se indica el número de accesión. Las cepas tipo se indican con una T. En los nodos se indican los valores de bootstrap significativos (>50%) .





## CAPITULO V.- DISCUSION GENERAL

### V.1 La diversidad genética en los nódulos de frijol de San Miguel

Las bacterias aisladas de nódulos de plantas de frijol, cultivadas bajo el sistema de milpa en San Miguel Acuexcomac, pertenecen a dos especies de *Rhizobium*. La mayor parte de los aislados fueron *R. etli*, mientras que *R. gallicum* se encontró en sólo el 10% de los nódulos. Aunque el número de aislados de *R. etli* fue mayor que el de *R. gallicum*, los niveles de diversidad genética ( $H$ ) encontrados a partir de los datos de isoenzimas fueron similares para ambas especies (Tabla 2 en Silva et al. 2003). En estudios sobre la diversidad genética de los rizobios del suelo se ha encontrado que en el suelo existe una mayor diversidad de genotipos que los que se encuentra en los nódulos (Bromfield *et al.*, 1995; Louvrier, et al., 1996; Segovia, et al., 1991; Young y Wexler, 1988). Esto es el resultado de un complejo proceso de selección de algunos genotipos por parte de la planta hospedera, de la competencia entre los distintos genotipos por los sitios de infección de la planta y por el efecto procesos estocásticos relativos al efecto fundador por parte de las poblaciones de bacterias cercanas a la raíz (Hagen y Hamrick, 1996). El resultado final del proceso de simbiosis es el reclutamiento de una fracción de las poblaciones simbióticas del suelo. Además se ha encontrado que en algunas especies de rizobios existen una gran cantidad de individuos que no tiene la capacidad simbiótica (Segovia, et al., 1991; Sullivan, et al., 1996). El estudio de la población de *R. etli* de la rizósfera de plantas de frijol mostró que existen al menos 40 individuos no simbióticos por cada individuo simbiótico (Segovia, et al., 1991). Por lo tanto, el presente estudio abarca sólo a la fracción de las poblaciones simbióticas de *R. etli* y *R. gallicum*, y dado que las poblaciones de hospederos, nódulos y bacterias son tan grandes, solo fue posible obtener una pequeña muestra de esta diversidad. En este punto también es importante notar que con la técnica utilizada para detectar la variación genética, las isoenzimas, sólo es posible detectar alrededor de un tercio de las mutaciones que producen variación genética (Enright y Spratt, 1999; Selander *et al.*, 1986). Las mutaciones que producen cambios sinónimos y las mutaciones que producen cambios de aminoácidos con cargas y tamaños semejantes no son detectadas con esta técnica. Aún así los niveles de diversidad son altos, sobre todo si se toma en cuenta que se trata del muestreo de una población local en una parcela de aproximadamente una hectárea. Otros estudios sobre la diversidad de *Rhizobium* asociado a frijol han obtenido valores de diversidad mayores, pero en algunos casos se trató de colecciones de cepas de distinto origen geográfico (Piñero, et al., 1988) o del muestreo de varias parcelas (Souza *et al.*, 1994). Inclusive en nuestro trabajo anterior en San Miguel encontramos niveles de diversidad mayores

(Silva, et al., 1999). Sin embargo, en ese trabajo el muestreo incluyó 485 aislados provenientes de 6 parcelas y se consideró que los aislados pertenecían a *R. etli*, cuando en realidad, como demostramos aquí, existen aislados de una segunda especie, *R. gallicum*. Este hecho elevó los valores estimados de diversidad genética. Este es también el caso en el trabajo de Piñero et al. (1988), el cual ahora se sabe contenía al menos a 4 de las especies de *Rhizobium* ahora reconocidas. Es muy probable que en el trabajo de Souza et al. (1994) las poblaciones analizadas también estuvieran constituidas por más de una especie. Por lo tanto destacamos la importancia de reconocer a las especies para obtener resultados correctos y realistas sobre la diversidad genética de las bacterias y su estructura genética. Para poder realizar análisis de genética de poblaciones, como su nombre lo indica, el primer paso es discernir a las especies para poder estudiar sus poblaciones.

## V.2 Las clonas epidémicas de los nódulos

Aún con las limitantes del muestreo de poblaciones de bacterias con tamaños efectivos casi infinitos, fue posible recuperar el mismo genotipo en numerosas ocasiones. Más de la mitad de los aislados de los nódulos tuvieron genotipos casi idénticos, constituidos por 3 ETs de *R. etli* cercanamente relacionados (Fig. 1 en Silva et al. 2003). Estos genotipos forman parte de los que se podría considerar un complejo clonal, con un genotipo ancestral a partir del cual algunas bacterias han ido divergiendo a través de mutación o recombinación (Feil y Spratt, 2001). La abundancia de este complejo clonal en los nódulos puede ser el resultado de una mezcla de factores. Las parcelas de milpa de San Miguel pueden considerarse como ecosistemas estables, durante siglos los campesinos han sembrado el mismo germoplasma de frijol, las técnicas agrícolas prácticamente no han evolucionado, y las condiciones ambientales parecen haberse mantenido constantes, ya que históricamente ha sido una zona semiárida con suelo erosionado y con un régimen de lluvias escaso (Souza et al., 1997). La constancia de las condiciones bióticas y abióticas parece haber permitido la coevolución de los genotipos de frijol y de las bacterias del suelo asociadas a ellos. La selección durante muchas generaciones de estos genotipos adaptados a las condiciones ambientales generales y en particular a los frijoles cultivados explicaría su abundancia en los nódulos y muy probablemente en el suelo (Silva, et al., 1999; Souza, et al., 1997).

Las plantas de frijol están presentes en el suelo solamente durante el período de lluvias (5 meses). Durante este período los nódulos determinados del frijol se van formando conforme la raíz crece. Los primeros nódulos senescen mientras otros se van formando. Las poblaciones de bacterias de los nódulos senescentes son liberadas al suelo y son una fuente importante en la infección de los

nódulos en formación. Este es uno de los mecanismos por los cuales algunos genotipos pueden estar siendo favorecidos en los nódulos. Al final de la época de crecimiento de la planta, cuando termina la floración y comienza la formación y maduración de las semillas, la planta deja de alimentar a los nódulos y éstos senescen (Sadowsky y Graham, 2002). De este modo, en la época posterior a la cosecha los genotipos de las bacterias que habitaron los nódulos enriquecen y predominan en la población de bacterias del suelo. Dado que la interacción entre las leguminosas y *Rhizobium* no es obligatoria, la coexistencia de bacterias no simbióticas y de genotipos menos competitivos o seleccionados por las plantas es posible. Las poblaciones del suelo son fuentes de variación genética que puede ser crucial en la evolución de los rizobios, tanto para el surgimiento de nuevos genotipos simbióticos, como para el potencial de supervivencia de las poblaciones ante cambios ambientales drásticos (Segovia, et al., 1991; Sullivan, et al., 1995).

### V.3 El nicho simbiótico de *R. etli* y *R. gallicum* en San Miguel

*R. gallicum* fue encontrado en sólo un 10% de los nódulos, confirmando que en México el simbionte principal del frijol común es *R. etli*. Este es el primer reporte de *R. gallicum* nodulando frijoles en América. Sin embargo, debido al pequeño número de nódulos formados por esta especie podríamos considerarlo un simbionte menor o incluso oportunista del frijol. Dado el amplio rango de hospederos que presentan las cepas de *R. gallicum*, otras leguminosas presentes en San Miguel (introducidas o nativas, silvestres o cultivadas), podrían ser también hospederos de esta especie. En nuestro estudio anterior (Silva, et al., 1999), encontramos que la mitad de los aislados de las plantas de *P. coccineus* (ayocote) pertenecían a la división I, ahora clasificada como *R. gallicum*. Hicimos algunos experimentos de laboratorio para determinar la capacidad competitiva de dos aislados de *R. gallicum* (aislados 6 y 2) y dos aislados de *R. etli* (aislados 16 y 17) inoculados a la misma densidad óptica sobre plantas de *P. vulgaris* y *P. coccineus*. Encontramos que entre el 90 y 70% de los nódulos de *P. coccineus* estuvieron ocupados por *R. gallicum*. En el experimento con *P. vulgaris*, encontramos que más de la mitad de los nódulos estaban ocupados por ambas especies, sin embargo, entre los nódulos de ocupación sencilla, *R. gallicum* ocupó sólo el 8%. En estos experimentos la asignación de los aislados se realizó por inspección visual y basada en las características morfológicas de las colonias (secas o gomosas). No obstante, estos experimentos fueron hechos una sola vez y tuvieron algunos problemas de contaminación con hongos, por lo que sería necesario repetirlos y mejorar el diseño experimental. Para obtener resultados estadísticamente confiables sería importante inocular un menor número de células para evitar ocupaciones dobles, inocular en diferentes

proporciones a las cepas y montar un método de detección menos subjetivo, como sería con cepas marcadas con el gen *gusA* (Vinuesa *et al.*, 2003). A pesar de sus deficiencias, estos experimentos apoyaron la percepción que teníamos de que *R. etli* es más competitivo en *P. vulgaris*, mientras que *R. gallicum* lo es en *P. coccineus*. Asimismo, sería interesante realizar experimentos de competencia entre los genotipos abundantes y los raros de *R. etli* para determinar si su abundancia se relaciona con su competitividad, o si se debe simplemente a su preponderancia numérica en el suelo.

Durante la época del año en la que el frijol no está cultivándose, las poblaciones de *Rhizobium* se mantienen en el suelo y podrían asociarse a las raíces de otras plantas e incluso entrar en simbiosis con algunas leguminosas que crecen naturalmente en las parcelas (Souza, *et al.*, 1997). Durante la época de secas se encuentra *Dalea* spp. creciendo en las parcelas de cultivo. Estas plantas se encontraron noduladas y los aislados de sus nódulos fueron capaces de formar nódulos con plantas de frijol en el laboratorio (Aldo Valera, comunicación personal). Es posible que tanto *R. etli* como *R. gallicum* tengan un nicho simbiótico extendido a otras leguminosas. *Leucaena leucocephala* es una leguminosa presente en el área de San Miguel y podría ser el hospedero principal de *R. gallicum*. Sería necesario muestrear los nódulos de las plantas del lugar para apoyar esta hipótesis.

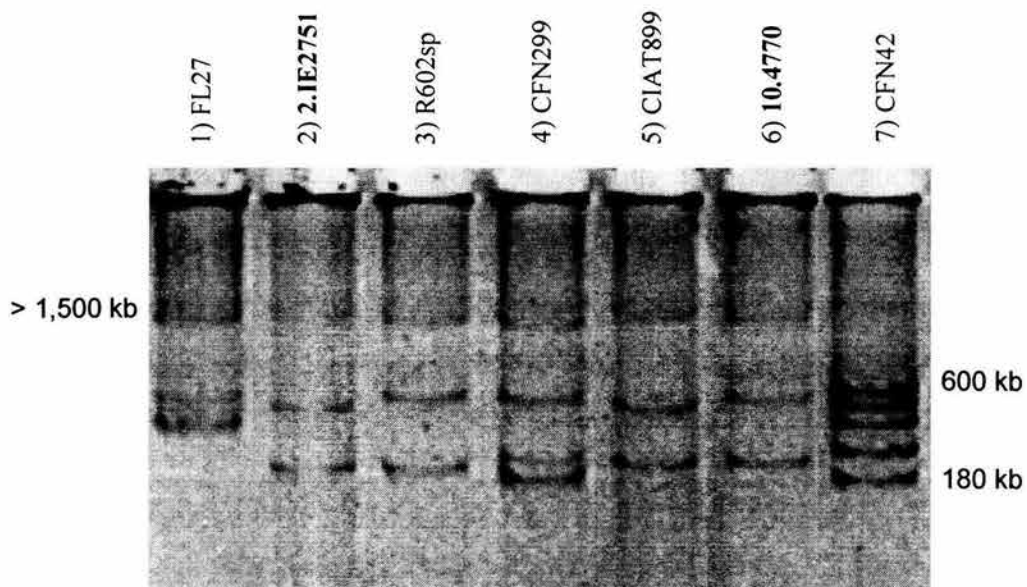
#### V.4 Los plásmidos de *R. etli* y *R. gallicum*

El análisis de la composición plasmídica de los aislados mostró que *R. etli* y *R. gallicum* tienen perfiles de plásmidos muy diferentes (Fig. 1 y Tabla 3 en Silva *et al.* (2003), Fig. 16 y Fig.17). Todos los aislados de *R. gallicum* tuvieron un megaplásmido de más de 1,500 kb. La presencia de megaplásmidos es común en muchas especies de *Rhizobium*. En muchas de ellas no ha sido posible curar estos megaplásmidos, lo cual sugiere que son indispensables para la sobrevivencia de las bacterias (García de los Santos, *et al.*, 1996). Los perfiles de plásmidos de *R. gallicum* son muy semejantes a los de *R. tropici* (Fig. 16). Ambas especies tienen rangos de hospedero mucho más amplios que *R. etli*. *P. vulgaris* es un especie relativamente reciente dentro de las leguminosas (Delgado-Salinas *et al.*, 1999) y se considera que *R. etli* coevolucionó con esta especie de frijol (Martínez-Romero, 2002; Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996; Parker, 2002). Por lo tanto, se podría especular que la presencia de megaplásmidos es un carácter ancestral en los rizobios y que posiblemente *R. etli* es una especie reciente que perdió esta característica. Asimismo, se podría plantear que los rizobios más antiguos evolucionaron hacia un rango de hospedero amplio y que en las especies de rizobios más recientes se han favorecido rangos de hospederos más estrechos. En este contexto es interesante notar que el género *Mimosa* es más antiguo que el género *Phaseolus*. Los

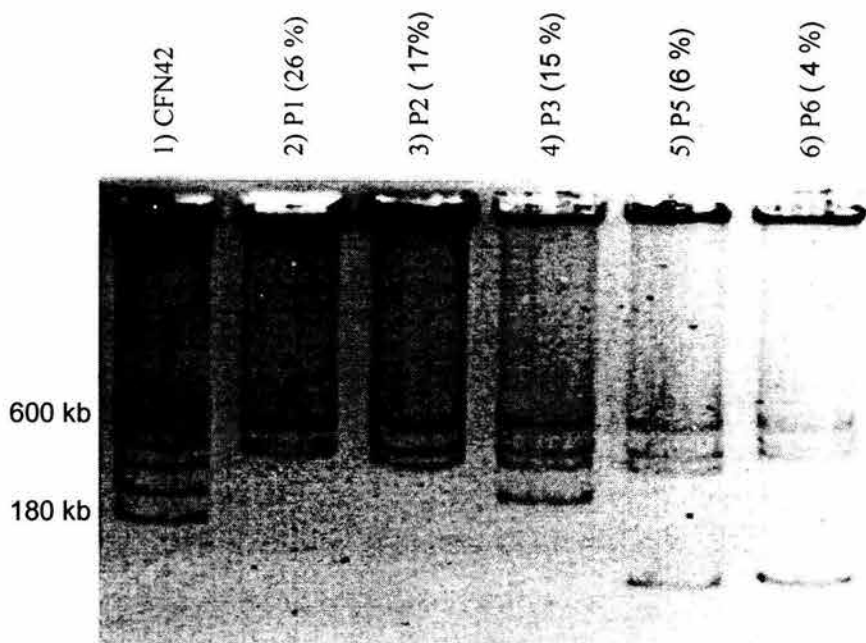
aislados de *R. etli* bv. *mimosae* suelen tener megaplásmidos entre 800 y >1,000 kb, y un rango de hospedero más amplio (Wang, et al., 1999), por lo que también podríamos especular que la biovar *mimosae* surgió antes que la biovar *phaseoli* de *R. etli*.

El análisis de la composición plasmídica de nuestros aislados mostró que dentro de cada especie existen combinaciones de plásmidos muy abundantes (Fig. 1 y Tabla 3 en Silva et al. (2003)). Dentro de *R. gallicum* el perfil P4 constituyó cerca de la mitad de los perfiles (44%). Dentro de *R. etli* el perfil P1 constituyó el 26% de los perfiles y junto con los perfiles P2 y P3 constituyeron más de la mitad de los perfiles encontrados (58%). Estos resultados sugieren que existen interacciones entre los plásmidos que hacen que algunas combinaciones sean más exitosas que otras. En todos los aislados de *R. etli* se encontró un plásmido grande de 700 kb y, casi en todos, uno mediano de 450 kb, seguidos de los plásmidos de 390 (44%) y 550 (31%) kb. Estos últimos nunca se encontraron juntos y son los que diferencian a los perfiles más abundantes P1 y P2 (Tabla 3 en Silva et al. (2003) y Fig. 17). Estas dos combinaciones fueron la base de la mayoría de los perfiles. Por ejemplo, los perfiles P3 y P5 son como el P2 pero con un plásmido pequeño de 250 y 125 kb, respectivamente, y el P6 es como el P1, pero con un plásmido de 125 kb (Fig. 17). Un estudio reciente sobre los plásmidos de una colección de cepas de *R. etli* mostró que muchos de los plásmidos pequeños son autotransferibles, como es el caso del plásmido más pequeño en la cepa CFN42 (p42a), que además es capaz de cotransferir al plásmido simbiótico (p42d) (Brom, et al., 2002). Para conocer más sobre el tipo de asociaciones que existen entre los plásmidos de la población de *R. etli* y *R. gallicum* de San Miguel se requieren análisis moleculares más detallados para obtener información más precisa sobre los patrones evolutivos de este compartimiento del genoma. Estudios ecológicos ayudarían a entender los factores que ejercen presiones selectivas sobre los distintos compartimientos del genoma y su efecto sobre los diversos estilos de vida de los rizobios.





**Figura 16.-** Perfiles de plásmidos de cepas representativas de *R. gallicum* y *R. tropici*. 1) *R. gallicum* FL27, 2) *R. gallicum* 2.IE2751, 3) *R. gallicum* R602sp, 4) *R. tropici* CFN299, 5) *R. tropici* CIAT899, 6) *R. gallicum* 10.4770 y 7) *R. etli* CFN42.



**Figura 17.-** Perfiles de plásmidos más abundantes de *R. etli* en San Miguel. Entre paréntesis se indica el porcentaje de aislados con cada perfil.

### V.5 Historia evolutiva de *R. etli* y *R. gallicum* en San Miguel

El hecho de que *R. gallicum* tenga un rango de hospedero más amplio y una mayor variabilidad genética nos sugiere que esta especie pudo haber adquirido la capacidad simbiótica antes que *R. etli*. *R. etli* tiene un rango de hospedero más estrecho y parece haber coevolucionado con el frijol (Aguilar *et al.*, 1998; Martínez-Romero, 2002; Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996). En los centros de origen, las variedades silvestres y en los países donde *P. vulgaris* ha sido introducido, *R. etli* es su principal microsimbionte. En un estudio reciente sobre los simbiosomas de 3 especies de *Phaseolus* silvestres (*P. parvulus*, *P. pauciflorus* y *P. pedicellatus*) en México se encontró que están noduladas por *Bradyrhizobium*, por lo que se propone que ésta es la condición ancestral en el género (Parker, 2002). *P. vulgaris* ocupa una posición relativamente derivada dentro del género (Delgado-Salinas, *et al.*, 1999), sugiriendo que la utilización de *Rhizobium* como simbiote es una innovación reciente de *P. vulgaris* y algunos de sus parientes cercanos, como *P. coccineus* (Parker, 2002). La poca variabilidad genética y la dominancia ecológica de *R. etli* son congruentes con una historia de especialización simbiótica reciente para esta especie. Probablemente *R. etli* adquirió la capacidad simbiótica durante la evolución de *P. vulgaris*. Nuestros datos podrían interpretarse como que *R. etli* adquirió de *R. gallicum* los genes simbióticos. Sin embargo, pudo haber sido adquirido de otra fuente no presente en nuestro muestreo y análisis. El hecho de que el gen *rrs* sea monomórfico apoya la idea de que *R. etli* es una especie que apenas ha empezado a acumular variación genética. La elevada variación genética del gen *nodB* de la población de *R. etli* puede relacionarse con la reciente evolución de *P. vulgaris* y la continua manipulación humana, que mantienen a los genes nodulación bajo selección diversificadora. Aunque también cabe la posibilidad de que la selección y recombinación esté ejercida sobre los genes adyacentes, como pudieran ser *nodA* y *nodC*.

### V.6 La distribución geográfica de *R. gallicum* (*sensu lato*) y *R. etli*.

En este trabajo proponemos que la especie *R. gallicum* (*sensu lato*) tiene al menos 4 biovariedades (*gallicum*, *phaseoli*, *mongolense* y *yanglingense*), que se distribuyen en Norte América (Laguerre, *et al.*, 1997; Sessitsch, *et al.*, 1997; Silva, *et al.*, 2003; Zurdo-Pineiro, *et al.*, No publicado), Europa (Amarger, *et al.*, 1997; Herrera-Cervera, *et al.*, 1999; Sessitsch, *et al.*, 1997), el Norte de África (Mhamdi *et al.*, 1999; Mhamdi, *et al.*, 2002) y Asia (Tan, *et al.*, 2001; van Berkum, *et al.*, 1998), es decir en el Hemisferio Norte.

Gran parte de las confusiones creadas en sistemática son el resultado de otorgarle demasiado peso a las adaptaciones ecológicas (Cohan, 2001; Lan y Reeves, 2001). Por ejemplo, en el caso de

bacterias patógenas de humanos y animales, se han creado nuevas especies para designar a aislados de una misma especie que producen cuadros clínicos diferentes (Lan y Reeves, 2001). En este trabajo estamos documentando un caso en el que se creó una nueva especie para describir una biovariedad o ecotipo nodulador de *M. ruthenica* perteneciente a la especie *R. gallicum*. El caso extremo de esta deficiente clasificación basada en caracteres ecológicos, está dado por el aislado USDA1877, con un alelo *rrs* del tipo de *R. etli*, que fue clasificado con *R. mongolense* por haber sido aislado de *M. ruthenica*. Este hecho suscita interesantes especulaciones sobre la evolución y distribución de *R. etli*. Esta especie únicamente se ha encontrado nodulando frijoles en varios continentes, y mimosas en México, por lo que se piensa que su origen es Americano y que se ha importado a otros continentes acarreado en las semillas de frijol (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998; Silva, *et al.*, 2003). Para determinar con precisión si este aislado de *M. ruthenica* es un *R. etli* sería necesario analizar más caracteres genéticos y ecológicos. Sería interesante determinar si su plásmido simbiótico es del tipo de *R. etli* bv. *phaseoli* o de *S. meliloti*. Este sería el primer reporte de *R. etli* en Asia y de una biovariedad distinta a *phaseoli* y *mimosae*. Esto podría sugerir que nuestra hipótesis sobre la reciente evolución de *R. etli* acoplada a la de *P. vulgaris* no es correcta, aunque tampoco se puede descartar que hubiera sido introducido a Asia con el frijol y que después adquiriera un plásmido simbiótico del tipo de *S. meliloti*.

### V.7 ¿Qué especies de rizobios hay en San Miguel?

Entre nuestros aislados encontramos uno (IE4771) con todas las características de *R. etli* bv. *phaseoli* (Tabla 3 en Silva *et al.* (2003)), pero con un alelo del gen *nifH* muy semejante al de la cepa de Mim2 de *R. etli* bv. *mimosae* (Wang, *et al.*, 1999). Además no fue posible amplificar el gen *nodB* de esta cepa con los oligonucleótidos y condiciones que amplificaron exitosamente alelos de otras cepas. Los aislados de *R. etli* bv. *mimosae* son distinguibles de *R. etli* bv. *phaseoli* por patrones de isoenzimas, por tener pSyms de mayor tamaño (600-630 kb), dos bandas de hibridización *nifH* (1.5 y 15 kb) y por tener un megaplásmido de entre 800 y >1,000 kb, entre otras (Wang, *et al.*, 1999). Todos los demás marcadores genéticos del aislado IE4771 lo asociaron claramente a *R. etli* bv. *phaseoli* (Tabla 3 en Silva *et al.* (2003)), sugiriendo que este aislado adquirió sólo una parte del pSym de la bv. *mimosae*. En el área de San Miguel existen muchas leguminosas silvestres, como acacias y mimosas, por lo que es muy posible que existan poblaciones de *R. etli* bv. *mimosae*.

El frijol (*P. vulgaris*) tiene fama de ser un hospedero promiscuo (Martínez, *et al.*, 1985; Martínez-Romero, 2002; Michiels *et al.*, 1998), por lo que es utilizado rutinariamente en pruebas de

rango de hospedero. En experimentos de laboratorio *P. vulgaris* puede nodular con muchos aislados diferentes de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*, aunque estas interacciones varían en el grado de efectividad de la simbiosis (Hernández-Lucas *et al.*, 1995). En la naturaleza, *P. vulgaris* suele nodular con una o más especies. En un trabajo reciente se inocularon plantas con suelo donde no se ha cultivado frijol recientemente y se encontraron 5 especies capaces de nodular *P. vulgaris*, entre ellas un *Sinorhizobium* (Herrera-Cervera, *et al.*, 1999). La dilución del suelo puede tener un fuerte efecto sobre las relaciones de competencia entre los rizobios presentes, de tal modo que la diversidad de especies noduladoras aumenta (Bala *et al.*, 2001). En el muestreo de más de 500 nódulos de *P. vulgaris* en San Miguel (378 en Silva *et al.* (1999) y 126 en Silva *et al.* (2003)) hemos encontrado únicamente dos grupos genéticos que corresponden a *R. etli* y *R. gallicum* (Silva, *et al.*, 2003). Esto nos hace suponer que las demás especies que se han descrito como noduladoras de frijol no están presentes. Sin embargo, no podemos descartar que estén presentes en el suelo pero que las cepas de *R. etli* y *R. gallicum* les impongan una barrera de competitividad infranqueable. En el análisis del gen *rrs* encontramos evidencia de la posible transferencia lateral de un fragmento del gen entre un aislado de *R. gallicum* y *R. tropici*. Esta última especie se ha encontrado nodulando frijol en muchos países (Amarger *et al.*, 1994; Anyango *et al.*, 1995; Diouf *et al.*, 2000; Martínez-Romero *et al.*, 1991) y se reconoce su gran capacidad competitiva en suelos ácidos (Vinueza, *et al.*, 2003). El suelo de San Miguel es básico (pH= 8.3), por lo que *R. tropici* pudiera estar presente pero ser poco competitiva en la nodulación. En México, *R. tropici* no se ha encontrado nodulando frijol, sólo existe un reporte en el que fue aislado de nódulos de *Gliricidia sepium* (Acosta-Durán y Martínez-Romero, 2002). Por otro lado, tampoco podemos descartar que la transferencia lateral entre *R. gallicum* y *R. tropici* hubiera sido un evento antiguo, durante la diversificación y divergencia de las especies de *Rhizobium*. Asimismo, en Silva *et al.* (2003) sugerimos que *R. leguminosarum* no se encuentra en los suelos de San Miguel. Esta especie tampoco ha sido encontrada nodulando frijol en México, lo cual apoya nuestro supuesto. Para resolver estas incógnitas, experimentos en laboratorio haciendo diluciones del suelo de San Miguel (para tratar de evitar la competencia entre poblaciones), podrían revelar la presencia de otros rizobios simbióticos. En estos experimentos la manipulación del pH aportaría información sobre el efecto de este factor ecológico sobre las relaciones de competitividad de los rizobios en el campo. De igual modo, el hecho de haber encontrado que nuestras poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum* aisladas de nódulos no comparten sus acervos genéticos, no descarta la posibilidad de que en las poblaciones del suelo pudieran ocurrir eventos de transferencia lateral entre las dos especies. El muestreo de las poblaciones de rizobios del suelo, sin utilizar plantas como

trampas, aportaría una gran cantidad de información que sería útil para resolver muchas de las cuestiones planteadas en rizobiología.

### V.8 ¿Existe aislamiento sexual entre las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum* de San Miguel?

A lo largo de este trabajo presentamos evidencia del aislamiento sexual entre las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum* aisladas de los nódulos de *P. vulgaris* cultivado en San Miguel. Sin embargo, como mencionamos en el inciso anterior, no podemos descartar la existencia de intercambio genético interespecífico en las poblaciones (simbióticas y no simbióticas) del suelo. Si esto fuera así, es posible que estos recombinantes tuvieran una menor adecuación que los individuos no recombinantes de las dos especies, ya sea en su sobrevivencia en el suelo durante la fase saprófaga de su ciclo de vida, o en su competitividad para la colonización e infección de la raíz de los frijoles. Además desconocemos el efecto selectivo que la planta hospedera pudiera ejercer sobre los genotipos recombinantes. Debido a que el frijol es un hospedero permisivo (promiscuo) y dado que se han reportado muchos casos de nodulación con quimeras producto de la transferencia lateral de genes, ya sea inducidos en el laboratorio (Hooykaas *et al.*, 1985; Hooykaas, *et al.*, 1982; Martínez, *et al.*, 1987; Rogel, *et al.*, 2001; Sivakumaran, *et al.*, 1997) o en condiciones naturales (Amarger, *et al.*, 1997; Herrera-Cervera, *et al.*, 1999), creemos que el aislamiento sexual entre las poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum* es real y no sólo un artefacto del muestreo. La información genética contenida en elementos móviles, como los plásmidos, es más propensa a la transferencia lateral, por lo que sería más probable encontrar recombinantes de los genes plasmídicos/simbióticos que analizamos. En el caso del gen *nifH*, encontramos que la mayoría de los alelos distintivos de cada especie son producto de la divergencia neutral, ya que la proteína producida es idéntica, por lo que la transferencia lateral de estos alelos no supondría ninguna penalización selectiva. Sin embargo, ni siquiera en el caso de *nifH* encontramos quimeras entre *R. etli* y *R. gallicum*, lo cual apoya nuestra conclusión sobre el aislamiento sexual entre esta especies.

Las poblaciones simpátricas de *R. etli* y *R. gallicum* que estudiamos comparten su hábitat y nicho ecológico, por lo que la falta de oportunidades ecológicas para el intercambio genético no puede dar cuenta de su aislamiento sexual. Asimismo, nuestros análisis indican que existe intercambio genético frecuente entre los miembros de las poblaciones de cada una de las especies, lo que indica que para ambas especies la recombinación (flujo génico) es una fuerza evolutiva importante para mantener la cohesividad de ambas especies. Entonces ¿Qué mecanismos pueden dar cuenta del aislamiento sexual entre ellas? Al parecer los rizobios no son naturalmente competentes

para la transformación, por lo que el intercambio genético ocurre por conjugación o transducción (Hynes y Finan, 1998). Es probable que la ausencia de intercambio genético entre *R. etli* y *R. gallicum* se deba a que sus sistemas de conjugación no son compatibles y a que no son infectados por los mismos tipos de bacteriófagos, lo cual daría cuenta de barreras “precigóticas” a la recombinación (Majewski, 2001; Mayr, 1970; Templeton, 1989). La evidencia que tenemos sobre el aislamiento sexual entre *R. etli* y *R. gallicum* se refiere a la ausencia de recombinación homóloga entre alelos de genes homólogos de ambas especies. La divergencia en secuencia promedio entre *R. etli* y *R. gallicum* para los 5 genes que analizamos es variable (18.5% para *nodB*, 13.2% para *glnII*, 10.3% para *atpD*, 3.4% para *nifH* y 2.6% para *rrs*), pero podría ser suficiente como para prevenir la formación del heteroduplex necesario para una recombinación exitosa, lo cual daría cuenta de una barrera “poscigótica” para la recombinación (Majewski, 2001; Mayr, 1970; Templeton, 1989). Se ha demostrado experimentalmente que la frecuencia de recombinación entre *Salmonella typhimurium* y *S. typhi* (con un nivel de divergencia de sólo 1%) es tres veces menos eficiente que entre los individuos de cada especie (Zahrt y Maloy, 1997). Tanto las barreras precigóticas como poscigóticas podrían ser las responsables de la ausencia de recombinantes entre *R. etli* y *R. gallicum*. Encontramos evidencia de recombinación entre un aislado de nuestra población de *R. gallicum* y *R. tropici* para el gen *rrs*, y posiblemente entre la cepa CFN42 de *R. etli* y *R. tropici* para el gen *atpD*. La divergencia en secuencia entre *R. gallicum* y *R. tropici* y entre *R. etli* y *R. tropici* es de la misma magnitud que entre *R. etli* y *R. gallicum*, por lo que nos inclinamos a pensar que las barreras precigóticas son las más importantes en el aislamiento entre estas dos últimas especies.

### V.9 Recomendaciones agroecológicas

En los pocos trabajos existentes sobre las bacterias que nodulan a *P. vulgaris* silvestre, sólo se ha encontrado a *R. etli* (Aguilar, et al., 1998; Souza, et al., 1994), apoyando la idea de que ésta es la especie que coevolucionó con él. Las plantas analizadas de *P. vulgaris* silvestre de México estuvieron noduladas por unos pocos genotipos de *R. etli*, con una diversidad genética muy baja (Souza, et al., 1994). Por otro lado, las variedades de *P. vulgaris* domesticadas muestran poca especificidad con respecto a los rizobios con los que pueden formar simbiosis. En los sitios donde el frijol ha sido introducido, es común encontrar, además de *R. etli*, a varias especies de rizobios nodulándolo (*R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. giardinii* y *Sinorhizobium* sp.) (Amarger, et al., 1994; Amarger, et al., 1997; Diouf, et al., 2000; Herrera-Cervera, et al., 1999; Mhamdi, et al., 1999; Mhamdi, et al., 2002; Sessitsch et al., 1997; Sessitsch, et al., 1997). Estas observaciones nos llevan a

sugerir que la domesticación del frijol y las prácticas agrícolas modernas han resultado en la pérdida de la especificidad de la interacción (Souza, et al., 1997). A diferencia de lo que suele ocurrir con otros sistemas (Altieri, 1986; Merrick, 1990; Odum, 1984), el efecto de la manipulación humana ha provocado que se aisle una mayor diversidad de simbioses del frijol. Sin embargo, el incremento de la diversidad de rizobios con los que el frijol nodula puede ser contraproducente para la eficiencia de la simbiosis. Este efecto ha sido documentado en el caso de los frijoles de Calpan (localidad situada a 30 km de San Miguel donde se siembran en monocultivo variedades de frijol comercial utilizando prácticas agrícolas modernas), donde existe una alta diversidad genética entre los rizobios noduladores, pero la mayoría de los nódulos formados son inefectivos (Souza, et al., 1997). En este sentido las bacterias asociadas a los frijoles de San Miguel muestran una estructura genética intermedia entre los ecosistemas naturales y los intensamente manejados. Este resultado, aunado a la gran cantidad de evidencias provenientes del estudio de otros aspectos favorables de los agroecosistemas tradicionales (Altieri, 1986; Merrick, 1990; Odum, 1984), apoya la idea de que los agroecosistemas tradicionales son ecológicamente más estables y sustentables. Proponemos que se debe mantener este tipo de manejo agrícola en los lugares donde ya es una práctica agrícola establecida (generalmente zonas marginales y con producción para autoconsumo), y que en las grandes áreas de cultivo comercial se fomente la introducción de métodos de manejo que traten de imitar las características de las milpas, que aumentan la estabilidad y sustentabilidad del ecosistema, como son el policultivo, la rotación de cultivos, la labranza mínima, etc.

Mhamdi et al. (1999 y 2001) analizaron la diversidad genética de las bacterias de nódulos de frijol inoculados con suelos de Túnez donde se cultiva el frijol. Debido a que *R. gallicum* se encontró en todos los sitios de muestreo, mientras que *R. etli* y *R. leguminosarum* fueron recuperados en sólo algunos sitios, Mhamdi et al. (1999) sugieren que en los lugares donde el frijol ha sido introducido, *R. gallicum* es una mejor opción para la inoculación. Sessitsch et al. (1997) y Amarger et al. (1997) reportan que la simbiosis entre los aislados de *R. gallicum* y *P. vulgaris* es muy eficiente. En un experimento en invernadero, realizado por Pedro Burgos (CIFN-UNAM, comunicación personal), se encontró que uno de nuestros aislados de *R. gallicum* (IE4868) inoculado en frijoles Negro Jamapa produjo un nivel de fijación de nitrógeno dos veces superior a la cepa CFN42 de *R. etli*. En el experimento sobre rango de hospederos del presente trabajo encontramos que los aislados de *R. gallicum* formaron en promedio un tercio del número de nódulos producidos por los aislados de *R. etli* (Tabla 4 en Silva et al. 2003), lo cual podría ser indicativo de que la simbiosis es más eficiente, ya que la planta estaría invirtiendo menos energía en la formación de los nódulos. El amplio rango de

hospederos potenciales de *R. gallicum*, aunado a su alta eficiencia simbiótica con el frijol, sugieren que la propuesta de Mhamdi et al. (1999) debe tomarse en cuenta en programas de inoculación en lugares donde el frijol sea introducido.

Un programa integral de manejo agrícola encaminado a aumentar la productividad de manera sustentable no sólo debe tomar en cuenta al microsimbionte sino también a muchos otros factores que influyen sobre la interacción rizobios-leguminosas y en general sobre el funcionamiento del agroecosistema (Brockwell, et al., 1995; Sessitsch *et al.*, 2003). Es claro que los programas de mejoramiento del germoplasma de las leguminosas deben enfocarse hacia el mejoramiento de su capacidad simbiótica, aspecto ignorado en los primeros programas de mejoramiento genético de plantas. El mejoramiento genético de microsimbiontes ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, la introducción de cepas mejoradas a los agroecosistemas ha sido poco exitosa (Brockwell, et al., 1995; Paaú, 1989; Sessitsch, et al., 2003). Se conocen varios aspectos de los rizobios que podrían utilizarse para manipular su capacidad competitiva, como son la sobreexpresión de genes involucrados directa o indirectamente con la fijación de nitrógeno (*nif*, *nod*, *fix*, *cbb<sub>3</sub>*, *hup*, etc), la introducción de genes que permiten la utilización de compuestos específicos (rizopinas, biotina, compuestos aromáticos, etc), y la producción de agentes antimicrobianos (bacteriocinas) (Brockwell, et al., 1995; Sessitsch, et al., 2003). Después de varias décadas de esfuerzos infructuosos para desarrollar inóculos exitosos, ha quedado claro que la meta de obtener un inóculo aplicable a todas las áreas de cultivo no es posible; se deben desarrollar inóculos adecuados a cada región particular. Paaú (1989) ofrece una estrategia para producir inoculantes efectivos para cualquier leguminosas en cualquier área geográfica, que consiste en aislar de los nódulos a los genotipos más abundantes de cada región y crear mutantes con capacidades de fijación de nitrógeno mejoradas. De este modo se aprovecha la capacidad competitiva y de persistencia de los genotipos ecológicamente dominantes para generar en ellos una capacidad de fijación aumentada (Paaú, 1989). Sin embargo, creemos que la selección de aislados con mayor capacidad de fijación de entre los genotipos abundantes es una opción menos costosa.

Por lo tanto, nuestras recomendaciones generales para programas de inoculación serían: 1) En suelos con poblaciones nativas simbióticas (como San Miguel), hacer un análisis de la diversidad genotípica de los rizobios nodulantes, seleccionar algunos aislados ecológicamente dominantes (adaptados a las condiciones bióticas y abióticas), hacer determinaciones de fijación de nitrógeno en invernadero y luego en campo, e inocular con el aislado o combinación de aislados más eficientes. 2) En suelos donde no hubiera rizobios simbióticos o poco eficientes (nódulos blancos, baja



productividad), inocular con cepas o combinaciones de cepas conocidas que tengan buenas posibilidades de establecerse, tomando en cuenta factores ecológicos relevantes, como el pH del suelo. Por ejemplo, se sabe que *R. tropici* es muy competitivo en suelos ácidos (Vinuesa, et al., 2003), mientras que *R. gallicum* y *R. etli* son preponderantes en suelos neutros o alcalinos (como los suelos de Túnez y San Miguel, respectivamente). El seguimiento de los experimentos de inoculación permitiría ir seleccionando a las cepas más eficientes y adaptadas a las condiciones de cultivo y ambientales en general. De esta manera se podría ir alcanzando la meta de mejorar la productividad agrícola sin necesidad de introducir organismos genéticamente modificados, cuya construcción consume muchos recursos y tiempo, y han mostrado ser poco eficientes en el campo (Brockwell, et al., 1995; Sessitsch, et al., 2003; Thies *et al.*, 1991; Thies *et al.*, 1991). Asimismo, bajo este esquema de mejoramiento genético y ecológico, la selección natural (incluyendo la transferencia lateral de genes que pudiera ocurrir naturalmente) sería la responsable de la generación de genotipos más eficientes y nuestro papel solamente consistiría en detectarlas y aumentar su representación numérica dentro de la comunidad del suelo.

## REFERENCIAS

- Acosta-Durán, C. y Martínez-Romero, E. (2002).** Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch. Microbiol.* **178**, 161-164.
- Aguilar, O. M., López, M. V., Riccillo, P. M., González, R. A., Pagano, M., Grasso, D. H., Puhler, A. y Favelukes, G. (1998).** Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3520-3524.
- Altieri, M. A. (1986).** *Agroecology*. Berkeley: University of California.
- Amann, R. y Kuhl, M. (1998).** *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 352-358.
- Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Amarger, N., Bours, M., Revoy, F., Allard, M. R. y Laguerre, G. (1994).** *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil* **161**, 147-156.
- Amarger, N., Macheret, V. y Laguerre, G. (1997).** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 996-1006.
- Anyango, B., Wilson, K. J., Beynon, J. L. y Giller, K. E. (1995).** Diversity of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4016-4021.
- Avise, J. C. (1994).** *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman y Hall.
- Bala, A., Murphy, P. y Giller, K. E. (2001).** Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 841-843.
- Boyer, P. D. (1997).** The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.
- Brewin, N. J. (1998).** Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In *The Rhizobiaceae*, pp. 417-429. Edited by H. P. Spaink, A. Kondorosi y P. J. J. Hooykaas. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Brochier, C., Philippe, H. y Moreira, D. (2000).** The evolutionary history of ribosomal protein RpS14: horizontal gene transfer at the heart of the ribosome. *Trends Genet.* **16**, 529-533.

- Brockwell, J., Bottomley, P. J. y Thies, J. E. (1995).** Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant Soil* **174**, 143-180.
- Brom, S., Girard, L., García-de los Santos, A., Sanjuan-Pinilla, J. M., Olivares, J. y Sanjuan, J. (2002).** Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2555-2561.
- Bromfield, E. S. P., Barran, L. R. y Wheatcroft, R. (1995).** Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Mol. Ecol.* **4**, 183-188.
- Broughton, W. J. y Perret, X. (1999).** Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 305-311.
- Brown, E. W., Kotewicz, M. L. y Cebula, T. A. (2002).** Detection of recombination among *Salmonella enterica* strains using the incongruence length difference test. *Mol. Phylogenet. Evol.* **24**, 102-120.
- Chen, W.-M., Laevens, S., Lee, T.-M., Coenye, T., de Vos, P., Mergeay, M. y Vandamme, P. (2001).** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1729-1735.
- Cheng, T. C. (1991).** Is parasitism symbiosis? A definition of terms and the evolution of concepts. In *Parasite host associations. Coexistence or conflict?*, pp. 15-36. Edited by C. A. Tof, A. Aeschlimann y L. Bolis. Oxford: Oxford University Press.
- Christensen, H. y Olsen, J. H. (1998).** Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding the  $\beta$  subunit of ATP synthetase. *FEMS Microb. Lett.* **161**, 89-96.
- Claridge, M. F., Dawah, H. A. y Wilson, M. R. (1997).** *Species: the units of biodiversity*. London: Chapman and Hall.
- Cohan, F. M. (1994).** The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary divergence in prokaryotes. *Am. Nat.* **143**, 965-986.
- Cohan, F. M. (1994).** Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 175-180.
- Cohan, F. M. (1996).** The role of genetic exchange in bacterial evolution. *ASM News* **62**, 631-636.
- Cohan, F. M. (2001).** Bacterial species and speciation. *Syst. Biol.* **50**, 513-524.

- Cohan, F. M. (2002).** What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 457-487.
- Cummings, M. P. y Clegg, M. T. (1998).** Nucleotide sequence diversity at the alcohol dehydrogenase 1 locus in wild barley (*Hordeum vulgare* spp. *spontaneum*): An evaluation of the background selection hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5637-5642.
- Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A. y Lavin, M. (1999).** Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Syst. Bot.* **24**, 438-460.
- Denison, R. F. (2000).** Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *Am. Nat.* **156**, 567-576.
- Diouf, A., de Lajudie, P., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martínez-Romero, E. y Gueye, M. (2000).** Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 159-170.
- Doolittle, R. F. (2002).** Microbial genomes multiply. *Nature* **416**, 697-700.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., Anderson, K. L. y Alberro, M. R. (1990).** A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. *J. Mol. Evol.* **31**, 383-388.
- Dowson, C. G., Hutchison, A., Brannigan, J. A., George, R. C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J. M. y Spratt, B. G. (1989).** Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8842-6.
- Dykhuisen, D. E. y Green, L. (1991).** Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J. Bacteriol.* **173**, 7257-7268.
- Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S. y Selander, R. K. (1995).** Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 507-512.
- Eardly, B. D., Wang, F.-S. y van Berkum, P. (1996).** Corresponding 16S rRNA gene segments in Rhizobiaceae and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil* **186**, 69-74.
- Eardly, B. D., Young, J. P. y Selander, R. K. (1992).** Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1809-1815.
- Enright, M. C. y Spratt, B. G. (1999).** Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**, 482-487.
- Farris, J. S., Källersjö, J., Kluge, A. G. y Bult, C. (1994).** Testing significance of congruence. *Cladistics* **10**, 315-319.

- Feil, E. J. y Spratt, B. G. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 561-590.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. y Perret, X. (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**, 394-401.
- Freiberg, C., Perret, X., Broughton, W. J. y Rosenthal, A. (1996). Sequencing the 500-kb GC-rich symbiotic replicon of *Rhizobium* sp. NGR234 using dye terminators and a thermostable "sequenase": a beginning. *Genome. Res.* **6**, 590-600.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. y Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- García de los Santos, A., Brom, S. y Romero, D. (1996). *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 119-125.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. y Young, J. P. W. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2037-2048.
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F. y Lawrence, J. G. (2002). Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2226-2238.
- Gogarten, J. P., Murphey, R. D. y Olendzenski, L. (1999). Horizontal gene transfer: pitfalls and promises. *Biol. Bull.* **196**, 359-362.
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M. A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Hernández-Celis, J. C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodríguez, O., Flores, M., Cevallos, M. A., Collado-Vides, J., Romero, D. y Dávila, G.

- (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome. Biol.* **4**, R36.
- Goodfellow, M., Manfio, G. P. y Chun, J. (1997).** Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In *Species: the units of biodiversity*. Edited by M. F. Claridge, H. A. Dawah y M. R. Wilson. London: Chapman and Hall.
- Gordon, D. M., Wexler, M., Reardon, T. B. y Murphy, P. J. (1995).** The genetic structure of *Rhizobium* populations. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 491-499.
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., De Ley, D. J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B., Strijdom, B. W. y Young, J. P. W. (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **41**, 582-587.
- Hagen, M. J. y Hamrick, J. L. (1996).** Population level processes in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii: The role of founder effects. *Molecular Ecology* **5**, 707-714.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. (1985).** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**, 160-174.
- Haukka, K., Lindstroem, K. y Young, J. P. W. (1998).** Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 419-426.
- Haukka, K., Lindstrom, K. y Young, J. P. W. (1996).** Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**, 352-359.
- He, X., Chang, W., Pierce, D. L., Seib, L. O., Wagner, J. y Fuqua, C. (2003).** Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J. Bacteriol.* **185**, 809-822.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. y Kolsto (2000).** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2627-2630.

- Hennecke, H., Kaluza, K., Thony, B., Fuhrmann, M., Ludwig, W. y Stackebrandt, E. (1985).** Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* **142**, 342-348.
- Hernández-Lucas, I., Segovia, L., Martínez-Romero, E. y Pueppke, S. G. (1995).** Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2775-2779.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J. y Sanjuan, J. (1999).** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**, 87-97.
- Hillis, D. M., Mortiz, C. y Mable, B. K. (1996).** *Molecular systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Hooykaas, P. J., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuink, A. J., van Brussel, A. A. y Schilperoort, R. A. (1985).** Expression of a *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *R. trifolii* Sym plasmid. *Plasmid* **14**, 47-52.
- Hooykaas, P. J., Snijdewint, F. G. y Schilperoort, R. A. (1982).** Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **8**, 73-82.
- Hooykaas, P. J. J., Klapwijk, P. M., Nuti, M. P., Schilperoort, R. A. y Rorsch, A. (1977).** Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium* ex planta. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 477-484.
- Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A. (1984).** The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Adv. Genet.* **22**, 209-283.
- Hull, D. L. (1997).** The ideal species concept -and why we can't get it. In *Species: the units of biodiversity*. Edited by M. F. Claridge, H. A. Dawah y M. R. Wilson. London: Chapman and Hall.
- Huson, D. H. (1998).** SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**, 68-73.

- Hynes, F. M. y Finan, T. M. (1998). General genetic knowledge. In *The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria*, pp. 25-43. Edited by H. P. Spaink, A. Kondorosi y P. J. J. Hooykaas. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Jain, R., Rivera, M. C. y Lake, J. A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. y Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**, 331-338.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. y Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**, 189-197.
- Kroll, J. S., Wilks, K. E., Farrant, J. L. y Langford, P. R. (1998). Natural genetic exchange between *Haemophilus* and *Neisseria*: intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12381-12385.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. y Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis (software). *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S. I., Rodríguez Casartelli, R. y Amarger, N. (1992). Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* **39**, 412-419.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. y Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**, 981-993.
- Laguerre, G., van Berkum, P., Amarger, N. y Prevost, D. (1997). Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4748-4758.



- Lan, R. y Reeves, P. (2001).** When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends Microbiol.* **9**, 419-424.
- Lawrence, J. G. (1997).** Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends Microbiol.* **5**, 355-359.
- Lawrence, J. G. (1999).** Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 519-523.
- Lawrence, J. G. (2000).** Clustering of antibiotic resistance genes: beyond the selfish operon. *ASM News* **66**, 281-286.
- Lawrence, J. G. (2002).** Gene transfer in bacteria: speciation without species? *Theor. Popul. Biol.* **61**, 449-460.
- Lawrence, J. G. y Ochman, H. (1997).** Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J. Mol. Evol.* **44**, 383-397.
- Lawrence, J. G. y Roth, J. R. (1996).** Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**, 1843-1860.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P. y Denamur, E. (1998).** *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1685-1695.
- Lenski, R. E. (1995).** Molecules are more than markers: new directions in molecular microbial ecology. *Mol. Ecol.* **4**, 643-651.
- Lenski, R. E. y Travisano, M. (1994).** Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6808-6814.
- Levin, B. R. y Bergstrom, C. T. (2000).** Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6981-6985.
- Li, W.-H. (1997).** *Molecular evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Long, S. R. (1989).** *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* **56**, 203-214.
- Long, S. R. (2001).** Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* **125**, 69-72.
- Louvrier, P., Laguerre, G. y Amarger, N. (1996).** Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4202-4205.

- Ludwig, W., Amann, R., Martínez-Romero, E., Schonhuber, W., Bauer, S., Neef, A. y Schleifer, K. H. (1998). rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant Soil* **204**, 1-19.
- Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 155-173.
- Madigan, M. T., Martiniko, J. M. y Parker, J. (2000). *Brock biology of microorganisms*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Maggi Solcà, N., Bernasconi, M. V., Valsangiacomo, C., Van Doorn, L. J. y Piffaretti, J. C. (2001). Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analysed by sequencing of four housekeeping genes (*atpD*, *glnA*, *scoB* and *recA*), and by *vacA*, *cagA*, *iceA* and *IS605* genotyping. *Microbiology* **147**, 1693-1707.
- Majewski, J. (2001). Sexual isolation in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 161-169.
- Mankin, A. S. (1997). Pectamycin resistance mutations in functional sites of 16S rRNA. *J. Mol. Evol.* **274**, 8-15.
- Martínez, E. (1994). Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* **161**, 11-20.
- Martínez, E., Palacios, R. y Sanchez, F. (1987). Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**, 2828-2834.
- Martínez, E., Pardo, M. A., Palacios, R. y Cevallos, M. A. (1985). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 10779-1786.
- Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S. y Collins, M. D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 412-421.
- Martínez-Romero, E. (2002). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* **In press**.
- Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Rev. Plant Sci.* **15**, 113-140.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P. y Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 417-426.

- Matic, I., Taddei, F. y Radman, M. (1996).** Genetic barriers among bacteria. *Trends Microbiol.* **4**, 69-72.
- Mayden, R. L. (1997).** A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In *Species: the units of biodiversity*. Edited by M. F. Claridge, H. A. Dawah y M. R. Wilson. London: Chapman and Hall.
- Maynard Smith, J. (1995).** Do bacteria have population genetics? In *Population genetics of bacteria*, pp. 1-12. Edited by e. a. Boumberg: Cambridge University Press.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M. y Spratt, B. G. (1993).** How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4384-4388.
- Mayr, E. (1970).** *Populations, species, and evolution*. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University.
- Merrick, L. (1990).** Crop genetic diversity and its conservation in traditional agroecosystems. In *Agroecology and small farming development*, pp. 3-12. Edited by M. A. Altieri y S. B. Hecht. Boston: CRC Press.
- Mhamdi, R., Jebara, M., Aouani, M. E., Ghrir, R. y Mars, M. (1999).** Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. *Biol. Fertil. Soils* **28**, 313-320.
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M. y Amarger, N. (2002).** Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 77-84.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C. W., Luyten, E. y Vanderleyden, J. (1998).** *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **26**, 193-205.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C. (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**, 948-950.
- Mylvaganam, S. y Dennis, P. P. (1992).** Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloaccula marismortui*. *Genetics* **130**, 399-410.
- Nei, M. (1987).** *Molecular evolutionary genetics*. NY: Columbia University Press.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000).** *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.

- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., Fraser, C. M. y et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329.
- Odum, E. P. (1984). Properties of agroecosystems. In *Agricultural ecosystems*, pp. 5-12. Edited by R. Lowrence, B. R. Stinner y G. J. House. New York: John Wiley and Sons.
- Paau, A. S. (1989). Improvement of *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 862-865.
- Page, R. D. M. y Holmes, E. C. (1998). *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Parker, M. A. (2001). Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent bradyrhizobium lineages associated with neotropical legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2076-2082.
- Parker, M. A. (2002). Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* species in northern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2044-2048.
- Paul, E. A. y Clark, F. E. (1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press, Inc.
- Pérez-Ramírez, N. O., Rogel, M. A., Wang, E., Castellanos, J. Z. y Martínez-Romero, E. (1998). Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**, 289-296.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamouisis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A. y Blattner, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529-533.
- Pesole, G., Bozzetti, M. P., Lanave, C., Preparata, G. y Saccone, C. (1991). Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 522-526.
- Pesole, G., Gissi, C., Lanave, C. y Saccone, C. (1995). Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 189-197.

- Piñero, D., Martínez, E. y Selander, R. K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2825-2832.
- Posada, D. y Crandall, K. A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Posada, D. y Crandall, K. A. (2001). Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst. Biol.* **50**, 580-601.
- Pupo, G. M., Lan, R. y Reeves, P. R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10567-10572.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. A., Pardo, M. A., Azpiroz, R., Girard, M. L., Calva, E. y Palacios, R. (1985). Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1170-1174.
- Rainey, P. B. y Travisano, M. (1998). Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**, 69-72.
- Reyes, V. G. y Schmidt, E. L. (1979). Population densities of *Rhizobium japonicum* strain 123 estimated directly in soil and rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 854-858.
- Rodríguez, C. y Romero, D. (1998). Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. *Genetics* **149**, 785-794.
- Rodríguez, F., Oliver, J. F., Marín, A. y Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**, 485-501.
- Rogel, M. A., Hernández-Lucas, I., Kuykendall, L. D., Balkwill, D. L. y Martínez Romero, E. (2001). Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adherence* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3264-3268.
- Rozas, J. y Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**, 174-175.
- Sadowsky, M. J. y Graham, P. H. (1998). Soil biology of the *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae*, pp. 155-172. Edited by H. P. Spaink, A. Kondorosi y P. J. J. Hooykaas. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Sadowsky, M. J. y Graham, P. H. (2002). The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. : Springer Verlag.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M. y Li, L. Y. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* **59**, 579-590.
- Schofield, P. R., Gibson, A. H., Dudman, W. F. y Watson, J. M. (1987). Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmid in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2942-2947.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R. y Martínez-Romero, E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 426-433.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. y Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 873-884.
- Sepúlveda, E. A. S. H. (2003). Evolución concertada entre miembros de una familia multigéncia en *Rhizobium etli*. , pp. 51: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., Akkermans, A. D. L. y de Vos, W. M. (1997). Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Mol. Ecol.* **6**, 601-608.
- Sessitsch, A., Howeieson, J. G., Perret, X., Antoun, H. y Martínez Romero, E. (2003). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Rev. Plant Sci.* **21**, 323-378.
- Sessitsch, A., Ramírez-Saad, H., Hardarson, G., Akkermans, A. D. y de Vos, W. M. (1997). Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1097-1101.
- Silva, C., Eguiarte, L. E. y Souza, V. (1999). Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.* **8**, 277-287.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E. y Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* odulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in mexico: Population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 884-893.

- Sivakumaran, S., Lockhart, P. J. y Jarvis, B. D. (1997).** Identification of soil bacteria expressing a symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Can. J. Microbiol.* **43**, 164-177.
- Smith, M. W., Feng, D. F. y Doolittle, R. F. (1992).** Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 489-493.
- Sneath, P. H. A. (1993).** Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 626-629.
- Snyder, L. y Champness, W. (1997).** *Molecular genetics of bacteria*. Washington, D. C.: ASM Press.
- Souza, V., Bain, J., Silva, C., Bouchet, V., Valera, A., Márquez, E. y Eguiarte, L. E. (1997).** Ethnomicrobiology: Do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*? *J. Ethnobiol.* **17**, 249-266.
- Souza, V., Eguiarte, L. E., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J. y Piñero, D. (1994).** Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1260-1268.
- Souza, V., Nguyen, T. T., Hudson, R. R., Piñero, D. y Lenski, R. E. (1992).** Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8389-8393.
- Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. (1998).** *The Rhizobiaceae*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Spratt, B. G. y Maiden, M. C. (1999).** Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**, 701-710.
- Sprent, J. I. (1995).** Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 401-407.
- Sprent, J. I. (2001).** *Nodulation in legumes*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Sprent, J. I., M., S. J. y Faria, S. M. (1987).** Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **317**, 111-129.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. y**

- Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1043-1047.
- Stackebrandt, E. y Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846-849.
- Sullivan, J. T., Eardly, B. D., van Berkum, P. y Ronson, C. W. (1996).** Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2818-2825.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B. y Ronson, C. W. (1995).** Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal and symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8995-8999.
- Sullivan, J. T. y Ronson, C. W. (1998).** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5145-5149.
- Swofford, D. L. (2002).** PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods (software). . Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. y Dreyfus, B. (2001).** Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* **183**, 214-220.
- Taboada, H., Encarnación, S., Vargas, M. C., Mora, Y., Martínez-Romero, E. y Mora, J. (1996).** Glutamine synthetase II constitutes a novel taxonomic marker in *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 485-491.
- Tajima, F. (1993).** Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics* **135**, 599-607.
- Tan, Z. Y., Kan, F. L., Peng, G. X., Wang, E. T., Reinhold-Hurek, B. y Chen, W. X. (2001).** *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 909-914.
- Templeton, A. R. (1989).** The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In *Speciation and its consequences*, pp. 3-27. Edited by D. Otte y J. A. Endler. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Terefework, Z., Nick, G., Suomalainen, S., Paulin, L. y Lindstrom, K. (1998).** Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 2**, 349-356.



- Thies, J. E., Singleton, P. W. y Bohlool, B. B. (1991).** Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 19-28.
- Thies, J. E., Singleton, P. W. y Bohlool, B. B. (1991).** Modelling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 29-37.
- Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Julliot, J.-S., Camut, S. y J., D. (1984).** Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: Host-specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.* **157**, 134-142.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., Gonzalez, V. y Brom, S. (2003).** Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **185**, 1681-1692.
- Turner, S. L. y Young, J. P. (2000).** The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 309-319.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N. y Matsuguchi, T. (1995).** Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. *J. Bacteriol.* **177**, 468-472.
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. y Eardly, B. D. (1998).** *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 13-22.
- van Berkum, P. y Eardly, B. D. (1998).** Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria*, pp. 1-24. Edited by H. P. Spaink, A. Kondorosi y P. J. J. Hooykaas. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindstrom, K. y Eardly, B. D. (2003).** Discordant phylogenies within the *rrn* loci of Rhizobia. *J. Bacteriol.* **185**, 2988-2998.
- van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. (1995).** The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**, 124-142.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.

- Vanderleyden, J. (1998).** Root associated nitrogen-fixing bacteria in retrospective and perspective. In *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Edited by C. Elmerich, A. Kondorosi y W. E. Newton. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H. P., Martinez-Romero, E. y Werner, D. (2003).** Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**, 159-168.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F. y Radman, M. (1997).** Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9763-9767.
- Wang, E. T., Rogel, M. A., García-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A. y Martínez-Romero, E. (1999).** *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 4**, 1479-1491.
- Wang, Y. y Zhang, Z. (2000).** Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* **146 ( Pt 11)**, 2845-2854.
- Ward, D. M. (1998).** A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 271-277.
- Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E. y Chen, W. X. (2002).** *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 2231-2239.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletie, D. A. y Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Sonnenberg, M. S. y Blattner, F. R. (2002).** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 17020-17024.
- Wernegreen, J. y Riley, M. A. (1999).** Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: A case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 98-113.

- Wernegreen, J. J., Harding, E. E. y Riley, M. A. (1997). *Rhizobium* gone native: Unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5483-5488.
- Willems, A. y Collins, M. D. (1993). Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 305-313.
- Willems, A., Fernández-Lopez, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., de Vos, P., Martínez Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adherens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adherens* comb. nov. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **In press**.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Woese, C. R. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8392-8396.
- Woese, C. R. (2002). On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8742-8747.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutuyavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V. y Nester, E. W. (2001). The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2317-2323.
- Xia, X. y Xie, Z. (2001). DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* **92**, 371-373.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. y Wang, Y. (2002). An index of substitution saturation and its application. *Mol. Phylogenet. Evol.* **26**, 1-7.

- Yap, W. H., Zhang, Z. y Wang, Y. (1999).** Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J. Bacteriol.* **181**, 5201-5209.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001).** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 89-103.
- Young, J. P. W. (1993).** Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In *New horizons in nitrogen fixation*, pp. 587-592. Edited by P. R., J. Mora y W. E. Newton. London: Kluwer Academic Publishers.
- Young, J. P. W. y Haukka, K. (1996).** Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**, 87-94.
- Young, J. P. W. y Johnston, A. W. B. (1989).** The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* **4**, 341-349.
- Young, J. P. W. y Wexler, M. (1988).** Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2731-2739.
- Zahrt, T. C. y Maloy, S. (1997).** Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9786-9791.
- Zurdo-Pineiro, J. L., Velazquez, E., Lorite, M. J., Brelles-Marino, G., Schroeder, E. C., Bedmar, E. J., Mateos, P. F. y Martinez-Molina, E. (No publicado).** Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes in Puerto Rico. *GeneBank submission* .

## AGRADECIMIENTOS

Todo mi respeto y gratitud a mi maestra Valeria Souza, quien me impulsó y apoyó intelectual, material y emocionalmente durante todos estos años de feliz convivencia y trabajo. A mi gran maestro Luis Eguiarte por haberme enseñado tantas cosas, apoyado y guiado durante todos estos años. A mi maestra Esperanza Martínez por haber sido tan entusiasta con el proyecto y apoyarme material e intelectualmente. A Pablo Vinuesa por revisar tan detalladamente esta tesis y por haberle dado nuevos bríos al proyecto y a mi vida.

Les agradezco a todos mis amigos y compañeros de laboratorio, Martha Rocha, Lulú Carral, Amanda Castillo, Aldo Valera, Arturo Silva, René Cerritos, Antonio Cruz, Jordan Golubov, Meli Mandujano, Erika Aguirre, Sara Good, Salvador Montes, Ana Escalante y Doña Silvia, por haberme querido, aguantado y apoyado durante todos estos años. Así como a otros amigos y compañeros, León Patricio, Luis Ramírez, Rodolfo Salas, Alejandra Vázquez, Rosalinda Tapia, Gumersindo, Carolina Espinoza, Juan Núñez, Rodolfo Dirzo y Cesar Domínguez, y en general a toda la comunidad del Instituto de Ecología.

Agradezco el gran apoyo que recibí de muchos compañeros y amigos del CIFN, David Romero, Susana Brom, Guillermo Dávila, Miguel Angel Cevallos, Marco Rogel, Rafael Díaz, Jaime Mora, Rafael Palacios, María de Lourdes Girard, Oscar Rodríguez, Georgina Hernández, Otto Geiger, Isabel López y Jesús Caballero, y en general a toda la comunidad del CIFN.

Agradezco los comentarios a la tesis de los miembros de mi jurado de examen, Pablo Vinuesa, Luis Eguiarte, Valeria Souza, David Romero, Esperanza Martínez, Miguel Angel Cevallos, Lorenzo Segovia y Juan Núñez.

Todo mi amor y gratitud a mi familia Romero, José, Carmen, María del Carmen, Fernando, Guillermina, María Luisa, Patricia, Carlos, Rodrigo, Olivia, Alvin, Alejandro y Adrián. A mi familia Silva, Jorge, Dolores, Victor, Marta, Raúl, Alicia, María Helena, Idalia, Martha y Teresa. Así como a mis grandes amigos y amigas, Claudia, Jaime, Vicky, Joel, Martha y Lili, por haberme apoyado y compartido momentos difíciles y de alegría.

Agradezco la hospitalidad y el interés de las familias de la comunidad de San Miguel Acuexcomac, sin las cuales este trabajo no se hubiera podido realizar.

Agradezco la asistencia técnica de Aldo Valera Vázquez, Rafael Díaz Méndez, Marco Antonio Rogel, Antonio Cruz Peralta y René Hernández.

Agradezco el apoyo económico brindando por CONACYT, DEGEP, Fertilizantes Líquidos, Fundación MacArthur, el Programa de doctorado en Ciencias Biomédicas y del Instituto del Ecología.



CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO



**PROGRAMA DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLÁSMIDOS BACTERIANOS**

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez.  
Director General de  
Administración Escolar.  
Presente.

Por este conducto me permito informar a usted que he leído y discutido el trabajo titulado "**Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum***", el cual presenta la M. en C. Claudia Verónica Silva Romero, con número de cuenta 96808302 y número de expediente 3961046, alumna del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para optar por el grado de Doctor en Ciencias.

El trabajo presentado consta, en su parte medular, de un artículo de investigación publicado en la revista *Applied and Environmental Microbiology*, así como un conjunto importante de resultados adicionales. En el artículo correspondiente, la M. en C. Silva es la primera autora. Este trabajo aporta resultados valiosos referentes a la genética de poblaciones y evolución de este importante grupo de bacterias. Asimismo, hace un relevante aporte teórico, al proveer un enfoque fresco y novedoso para el problema de las especies bacterianas.

Considero que el trabajo experimental presentado, así como la discusión del mismo, reúnen ampliamente los requisitos académicos de calidad y originalidad necesarios para ser aceptado como tesis para obtener el grado de Doctor, por lo que emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted,

A t e n t a m e n t e  
Cuernavaca, Mor., 19 de mayo de 2003.

Dr. David René Romero Camarena  
Investigador Titular "C" de T. C.

E-mail: dromero@cifn.unam.mx



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez

Director General de Administración Escolar,

Universidad Nacional Autónoma de México

PRESENTE

**INSTITUTO DE ECOLOGIA**  
Departamento de Ecología Evolutiva

23 de mayo de 2003

En relación al manuscrito de tesis "*Genética de poblaciones y evolución molecular de Rhizobium etli y Rhizobium gallicum*" presentado por la **M. en C. Claudia Verónica Silva Romero** (número de cuenta 96808302 y número de expediente 3961046, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctora en Ciencias), quiero señalar que me parece que sin lugar a dudas reúne los requisitos para ser considerado como una Tesis de Doctorado, ya que es un estudio serio y novedoso, el cual está muy bien analizado y sustentado con teoría sólida. Asimismo, el estudio tiene un artículo recientemente publicado y dos artículos más en preparación.

Por lo tanto acepto que esta tesis sea presentada en el examen de grado y emito mi **voto aprobatorio** al respecto.

Agradezco de antemano su atención a la presente.

Atentamente,

Dr. Valeria Souza Saldívar

Investigador Titular B de T. C.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**INSTITUTO DE ECOLOGIA**  
Departamento de Ecología Evolutiva

23 de mayo de 2003

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Presente

He revisado con cuidado y detalladamente el manuscrito de Tesis Doctoral "*Genética de poblaciones y evolución molecular de Rhizobium etli y Rhizobium gallicum*" escrita por la Maestra en Ciencias Claudia Verónica Silva Romero (número de cuenta 96808302 y número de expediente 3961046) inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctora en Ciencias.

Considero que el trabajo es excelente y que indudablemente reúne los requisitos para ser considerado como una Tesis de Doctorado y por lo tanto la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por las razones anteriores, emito mi voto aprobatorio al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

  
Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns  
Investigador Titular C de T. C.





CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO



26 de mayo de 2003

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum***" de la **M. en C. Claudia Verónica Silva Romero** con número de cuenta **96808302** y número de expediente **3961046**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

En mi opinión este trabajo se caracteriza por una profundidad teórica y rigor técnico sobresalientes, lo cual denota que la M. en C. Claudia V. Silva Romero tiene un alto potencial como investigadora de primera línea. Ello se refleja también en el hecho de que además de la excelente publicación incluida en el manuscrito de tesis (capítulo II), se vislumbran claramente otras dos publicaciones de alto impacto, derivadas de los capítulos III y IV. Por todo ello ha sido un deleite intelectual revisar esta tesis de doctorado.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann  
Investigador Asociado "C" de T. C.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACION DE NITROGENO



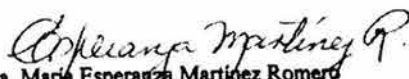
27 de mayo de 2003

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
**Director General de Administración Escolar,**  
**UNAM**  
**P R E S E N T E**

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum***" de la M. en C. **Claudia Verónica Silva Romero** con número de cuenta **96808302** y número de expediente **3961046**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

  
Dra. **María Esperanza Martínez Romero**  
Investigador Titular "C" de T. C.



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

27 de mayo de 2003

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
PRESENTE

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum***" de la M. en C. Claudia Verónica Silva Romero con número de cuenta 96808302 y número de expediente 3961046, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Lorenzo Segovia Forcella  
Investigador Titular "A" de T. C.



TELS. (52) 56 22 76 00 TELS. (7) 329 15 00 FAX. 317 23 88  
APOD. 510 3, CUERNAVACA, MORELOS, 62250, MÉXICO.



**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**  
**Departamento de Ecología Evolutiva**  
*Lab. Genética Ecológica y Evolución*  
Tel. (52 55) 5622-9005. Fax (52 55) 5622 8995


21 de mayo de 2003

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Por este conducto me permito informarle que después de haber revisado el trabajo de tesis titulado "**Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium elli* y *Rhizobium gallicum***" de la M. en C. **Claudia Verónica Silva Romero** con número de cuenta **96808302** y número de expediente **3961046**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Investigador Titular B, de T. C.

---

Instituto de Ecología, UNAM. Circuito exterior s/n, junto al Jardín Botánico, Ciudad Universitaria, Distrito Federal. C.P. 04510, Apartado Postal 70-27. MÉXICO.



CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO



19 de mayo de 2003

**Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez**  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum***" de la **M. en C. Claudia Verónica Silva Romero** con número de cuenta **96808302** y número de expediente **3961046**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos  
Investigador Titular "A" de T. C.



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
*UNAM*