



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

GENETICA DE POBLACIONES DE *Rhizobium etli*  
ASOCIADO A *Phaseolus vulgaris* L. EN DOS  
LOCALIDADES DEL BAJIO MEXICANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JAIME GASCA PINEDA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA  
LEOPOLDINA DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR

2004

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
 "Genética de poblaciones de Rhizobium etli asociado a Phaseolus vulgaris L.  
 en dos localidades del Bajío mexicano."

realizado por Gasca Pineda Jaime

con número de cuenta 09528996-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina	
Propietario	de María de Guadalupe Souza Saldívar	
Propietario	Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns	
Propietario	Dra. María Esperanza Martínez Romero	
Suplente	Dra. Claudia Veronica Silva Romero	
Suplente	Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas	

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Valeria Souza en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM.



A mi familia:

A mi mamá, mi papá y mi hermana, este trabajo es gracias a su apoyo y amor incondicionales.

Agradecimientos.

A mis amigos del muégano: Odeth, Dulce, Yani, Minako, Irais, Elvia, Magali, Violeta, Andrés, Sergio y Orestes. Gracias por su amistad y por todos y cada uno de los momentos, buenos y malos, que compartimos a los largo de la carrera.

A los ases de la prepa: Alejandro, Ismael y Manuel. Nuestras diferencias en la forma de comprender al mundo nos complementan.

A Olga, que ha estado conmigo en estos tiempos difíciles. Gracias muñeca.

Mis amigas del taller: Xitlali y Andrea. Realmente hicieron más agradables todas esas horas de laboratorio.

También a los couches de Buceo: Manuel y Emmanuel. Conocí gracias a ustedes un nuevo mundo además de dos grandes amigos.

A todos gracias por el apoyo y cariño durante la carrera.

Quiero agradecer a todos de los maestros que me enseñaron lo maravilloso de la Biología.

Valeria y Luis, por siempre brindar sus valiosos conocimientos.

Aldo y Martha, por su apoyo durante el taller y la realización de mi tesis. Aldo también te agradezco por ofrecerme tus conocimientos y experiencia en el laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio, que siempre han estado dispuestos a ayudar.

A mis sinodales, gracias por la paciencia para leer mis ocurrencias:

Claudia, por su gran entusiasmo al revisar mi tesis.

Esperanza, por sus valiosas contribuciones a mi trabajo.

Alfonso, por su interés y cuidadosa revisión de mi tesis.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Presentación</b> .....	3
<b>1 Introducción</b> .....	4
1.1 La fijación biológica de nitrógeno: un proceso importante.....	4
1.2 Los organismos de estudio.....	5
1.2.1 <i>Rhizobium</i> : el huésped a analizar.....	5
1.2.2 <i>Phaseolus vulgaris</i> : el hospedero.....	7
1.3 La asociación leguminosa- bacteria.....	9
1.3.1 El nódulo y el proceso de nodulación.....	9
1.4 Genética de poblaciones de <i>Rhizobium</i> .....	13
1.4.1 Diversidad genética de <i>Rhizobium</i> .....	13
1.4.2 Efectos de la domesticación de <i>P. vulgaris</i> en la genética de poblaciones de <i>Rhizobium</i> .....	17
1.4.3 Genética de poblaciones de <i>Rhizobium</i> y agronomía.....	18
<b>2 Zona de estudio</b> .....	19
<b>3 Objetivos</b> .....	22
<b>4 Método</b> .....	23
<b>5 Resultados</b> .....	29
5.1 Patrones de restricción enzimática del gen 16S ribosomal.....	29
5.2 Diversidad y estructura genética.....	31
5.3 Flujo genético.....	35
5.4 Relaciones genéticas.....	35
5.4.1 Relaciones genéticas entre aislados de los distintos tipos de planta.....	37
5.5 Análisis de desequilibrio de ligamiento.....	38

5.6	Análisis de los datos considerando a los ribotipos como grupos genéticos. . . . .	42
5.7	Análisis de secuencias . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Discusión . . . . .</b>	<b>51</b>
6.1	El uso de los patrones de restricción del gen 16S ribosomal para la identificación de especies y grupos genéticos. . . . .	51
6.2	Diversidad y diferenciación genética. . . . .	51
6.3	Flujo genético . . . . .	53
6.4	Relaciones genéticas. . . . .	54
6.5	Desequilibrio de ligamiento . . . . .	55
6.6	Recapitulando los datos . . . . .	57
6.7	Análisis de secuencias del gen 16S ribosomal . . . . .	60
6.8	Grupos genéticos y ribotipos. . . . .	61
<b>7</b>	<b>Conclusiones . . . . .</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Anexo . . . . .</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía. . . . .</b>	<b>74</b>

## Resumen.

El proceso de la fijación biológica de nitrógeno es también realizado en simbiosis por bacterias conocidas como rizobios, las cuales se asocian con plantas leguminosas, como lo es el frijol (*Phaseolus vulgaris*), que además representa uno de los principales cultivos en Latinoamérica. En este trabajo se analiza la estructura de la genética poblacional de las bacterias asociadas a plantas de frijol en un complejo de plantas silvestres, silvestroides y domesticadas ("wild-weedy-crop complex") encontrado en el Bajío mexicano. Los resultados obtenidos mediante la restricción del gen 16S ribosomal muestran que la especie de rizobio asociada a *P. vulgaris* en la zona de estudio es *Rhizobium etli*. En el análisis de MLEE se presenta menor diversidad genética ( $H_E$ ) en las bacterias asociadas a plantas domesticadas; los análisis de diferenciación genética muestran que las bacterias asociadas a plantas silvestroide (weedy) y domesticadas se encuentran menos diferenciadas entre sí. En el análisis de relaciones genéticas se observa un grupo divergente que se compone de cepas de plantas silvestres. Los análisis de desequilibrio de ligamiento indican que la población tiene una estructura clonal, pero que mantiene ciertos niveles de recombinación. Por otra parte, los patrones obtenidos mediante las enzimas de restricción del gen 16S ribosomal así como las secuencias del mismo gen, mostraron un polimorfismo en las bacterias analizadas, lo que divide a la muestra en dos grupos (ribotipos). Éstos muestran distintos valores en su diversidad genética, así como en sus valores de diferenciación, sin embargo, los análisis de relaciones genéticas no indican que exista una separación de ellos como grupos independientes, además los valores de flujo genético ( $N_m$ ) sugieren que pueden estar manteniendo niveles de recombinación suficientes como para evitar que diverjan como unidades evolutivas independientes. El análisis conjunto de los datos indica que la domesticación de *Phaseolus vulgaris* tiene una fuerte influencia sobre los genotipos de rizobios con los que se asocia, tanto así que es mayor el efecto de domesticación que la separación geográfica en la diferenciación genética, lo cual se debe a la existencia de un acervo genético de bacterias que se asocian exclusivamente con plantas silvestres.

## Abstract.

The biological nitrogen fixing process is also accomplished by symbiotic bacteria called rhizobia. These bacteria associate exclusively with legume plants like *Phaseolus vulgaris* L. which represents one of the most important crops in Latinoamerica. In this work an analysis of populations genetics of the associated bacteria was made with different kinds of plants of the "wild-weedy-crop" complex founded in two localities of the Bajío mexicano. The results obtained with the 16S ribosomal gene restriction show that *Rhizobium etli* is the nodulating specie in the analyzed sample. In the MLEE analysis a decreasing in the genetic diversity ( $H_E$ ) was observed in the bacteria associated with domesticated plants. The genetic differentiation analysis shows that the isolated bacteria from weedy and domesticated plants are less differentiated. Therefore, in the genetic relations analysis a divergent group was observed and consists only of isolates of wild plants. The analyses of linkage disequilibrium indicate that the population has a clonal structure, but maintains certain levels of recombination. On the other hand, the technique of restriction enzymes of the 16S ribosomal gene as well as the sequences of the same gene, showed a polymorphism in the analyzed strains, which at first, can divide the total sample in two groups (ribotipos). However, these groups show different values in their genetic diversity, as well as in their values of differentiation and linkage disequilibrium, nevertheless, the analyses of genetic relations do not indicate the separation of them as independent groups, besides which, the values of genetic flow ( $Nm$ ) suggest that they can be maintaining sufficient levels of recombination to prevent them from diverging as independent evolutionary units. The overall analysis shows that the domestication of *Phaseolus vulgaris* has a strong influence on the genotypes of rhizobia with that associates, the effect of domestication is greater than the effect of geographical separation in the genetic differentiation. The wild plants present one array of bacteria genetically different to the associated with weedy and domesticated plants.

## Presentación.

Los seres vivos que habitamos en este planeta somos el resultado de la evolución. La vida se expresa de muy diversas formas, por lo que resulta evidente que el proceso evolutivo puede llevar a los organismos por muy distintos caminos. Sin embargo, resulta imposible pensar en el proceso evolutivo teniendo a los seres vivos aislados, ya que la evolución involucra la interacción de los seres vivos entre ellos y su medio, es decir, la evolución se desarrolla dentro de un marco ecológico. Los procesos ecológicos que ocurren en la naturaleza dan lugar a interacciones simbióticas (Douglas, 1956), las cuales pueden ser tan variadas y complejas como organismos haya en un ecosistema.

La simbiosis leguminosa–bacteria es un apasionante ejemplo de las interacciones que pueden tener lugar entre organismos. La asociación entre los rizobios y leguminosas ha sido estudiada ampliamente durante las últimas décadas, con una variedad de propósitos y enfoques. Esto está influenciado por la importancia de las leguminosas para el hombre ya éstas representan una fuente de alimento. Los análisis pueden orientarse desde la genética elemental de los organismos en cuestión, hasta un punto de vista ecológico, incluyendo taxonomía, fisiología, etc.

Debido a que en México se localiza uno de los centros de domesticación de una leguminosa tan importante como lo es *Phaseolus vulgaris* L., resulta vital estudiar y comprender los procesos que están influenciando su asociación con bacterias simbióticas. En el presente trabajo se realiza un estudio teniendo el enfoque de la genética de poblaciones de las bacterias que se asocian al frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en dos localidades del Bajío mexicano, en donde se encuentra un complejo de plantas silvestres, domesticadas (cultivares) y plantas resultado de la cruce entre los dos tipos de plantas anteriores.



## 1 Introducción.

### 1.1 La fijación biológica de nitrógeno: un proceso importante.

El nitrógeno es un elemento necesario para todos los organismos en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos (Brock et al., 1996), sin embargo, el 78 % del nitrógeno se encuentra en la atmósfera en forma molecular ( $N_2$ ), forma en la cual no puede ser aprovechada por la mayoría de seres vivos. Para que el nitrógeno pueda ser utilizado por las plantas necesita ser "fijado" (combinado), con otros elementos para formar compuestos solubles como amonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ) (Brock et al., 1996). Existen varios procesos por medio de los cuales el nitrógeno atmosférico puede convertirse en formas utilizables, tal como lo es la fijación atmosférica, la fijación por fenómenos volcánicos, por fijación industrial y por la fijación biológica del nitrógeno, la cual se lleva a cabo exclusivamente por procariontes que presentan la enzima nitrogenasa (Brock et al., 1996).

Las bacterias que llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno pueden ser de vida libre (*Clostridium*, *Azotobacter*, etc.) y simbióticas. Éstas últimas pertenecen a distintos grupos de procariontes, tal es el caso del actinomicete del género *Frankia*, que se asocia con plantas de los géneros *Alnus*, *Myrica*, *Ceanothus*, o el género de cianobacterias *Anabaena*, que se asocia con un helecho acuático del género *Azolla* (Brock et al., 1996). Uno de los grupos más estudiados de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno son los rizobios, nombre con el que se refiere colectivamente a las bacterias que se asocian exclusivamente con plantas de la familia Leguminosae (con la excepción del género *Parasponia* de la familia Ulmaceae) (Rhijn et al., 1995; Brock et al., 1996; Wang et al., 2001). El proceso de la fijación simbiótica del nitrógeno en las leguminosas ocurre dentro de órganos producidos por las plantas llamados nódulos y se lleva a cabo por el complejo enzimático del sistema de la

nitrogenasa, cuyo primer producto estable es el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). De manera global el proceso consiste en la reducción del nitrógeno molecular a dos moléculas de amoníaco (Lehninger, 1989). Se estima que la cantidad de nitrógeno fijado de esta forma es de 75 millones de toneladas por año en el planeta (Brockwell et al., 1995). En los agrosistemas, el nitrógeno fijado puede fluctuar entre 30 y 300 Kg. por hectárea por año (Peopel et al., 1995).

Debido de lo anterior, la fijación biológica de nitrógeno resulta particularmente importante para el humano, ya que, además de que muchas leguminosas se cultivan para el consumo humano y forraje, también se utilizan a las leguminosas para el control de la erosión del suelo. Las leguminosas también son importantes para la reforestación de suelos pobres en nitrógeno, ya que las plantas noduladas tienen una ventaja en suelos no fertilizados, por lo que se les considera como abono verde (Ahmad, 1984; Brock et al., 1996).

## 1.2 Los organismos de estudio.

### 1.2.1 *Rhizobium*: el huésped a analizar.

*Rhizobium* es un género de bacterias Gram–negativas de la familia Rhizobaceae, del orden Rhizobiales, que pertenecen a la clase de las  $\alpha$ -proteobacterias. Tienen forma de bastón y metabolismo aeróbico; en laboratorio muestran un crecimiento rápido (colonias > 2mm de 3 a 5 días en YMA) y no producen esporas. La temperatura ideal para su crecimiento es de 30°C, y éste se disminuye a los 37°C, pueden tener de 6 a 12 flagelos. La familia presenta 3 géneros, *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium*, aunque se ha propuesto incorporar los géneros *Agrobacterium* y *Allorhizobium* al género *Rhizobium* (Wang et al., 2001; Young, 2001; Sadowsky y Graham, 2002, Sawada et al., 2003). Se han definido hasta ahora trece especies para el género *Rhizobium*, que forman un grupo polifilético y están subdivididas en variedades o subgrupos con base en sus

diferencias en la especificidad del hospedero, entre otras características (Brock et al., 1996; Sawada et al., 2003). De hecho, el nombre de la especie del microsimbionte generalmente refleja el nombre de la planta hospedera, lo cual sugiere un proceso de asociación especie específico. Sin embargo, es claro que la el grado del rango de hospederos varía considerablemente entre los rizobios. Técnicas como la clonación y mutagénesis se ha mostrado que la inactivación de un solo gen afecta drásticamente el rango de hospedería de un linaje particular (Rhijn et al., 1995).

Puede resultar complicado definir especie en bacterias (Wang et al., 2001; Silva et al., 2003), por lo que la taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico, es decir, se incluyen diversos aspectos como morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. Se han utilizado distintas técnicas moleculares que permiten una descripción más precisa de las especies (Wang et al., 2001; Sawada et al., 2003). Tal es el caso del gen 16S rRNA, que se ha usado ampliamente para reconocer las distintas especies de bacterias. La técnica de RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) de este gen se ha usado como método para reconocer distintas especies de *Rhizobium* (Laguerre et al., 1994; Silva et al., 2003).

Los rizobios se presentan en diversos nichos ecológicos. Se les encuentra como saprófagos viviendo de los nutrimentos del suelo, viven en la rizósfera de leguminosas y otras plantas como rizobacterias, en donde utilizan como fuente de carbono y energía los exudados producidos por la planta, además pueden colonizar el nicho ecológico de los nódulos (Brock et al., 1996, Sadowsky y Graham, 1998). Alternan entre sus estadios de vida etapas de vida libre en el suelo y la rizósfera, con estadios endosimbióticos, en los que las células se alojan en compartimentos intracelulares del tejido central del nódulo (Sadowsky y Graham, 1998), para posteriormente ser liberados nuevamente a la rizósfera (en el caso de no haberse diferenciado), en donde pueden nodular a otra planta, o bien permanecer en el suelo.

### 1.2.2 *Phaseolus vulgaris*: el hospedero.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) pertenece a la familia Leguminosae subfamilia Papilionoidae, tribu Phaseoleae y subtribu Phaseolinae (Engleman, 1979). Se han descrito 74 especies para el género (Freytag y Debpuck, 2002) de las cuales alrededor de 50 se encuentran en México (Doyle, 1994). En estado silvestre, *P. vulgaris* presenta un hábito anual, crece como enredadera, tiene vaina dehiscente y no presenta raíces tuberosas. Se tienen registros de la domesticación del frijol común en alrededor 4000 años de antigüedad (Kaplan y Lynch, 1999) y probablemente ha estado bajo eventos de domesticación independientes, teniendo dos centros de domesticación, uno en Mesoamérica y otro en Sudamérica, con plantas silvestres morfológica y bioquímicamente distintas (Gepts y Debouck, 1991). Sin embargo, se han reconocido tres distintas pozas génicas, en Mesoamérica, en los Andes y una ancestral en el Ecuador y norte de Perú (Singh et al., 1991; Beebe et al., 1997).

El frijol común representa la fuente principal de proteínas para el pueblo mexicano (SAGAR, 1995), y es una de las legumbres más importantes en el mundo (Gentry, 1969), debido a esto se han llevado a cabo diversos estudios de la planta, que van desde taxonómicos hasta de genética de poblaciones (Souza y Delgado, 1979; Escalante et al., 1994). Asimismo, se ha explorado a detalle su asociación con rizobios, ya que esto representa una fuente natural de nitrógeno, lo cual se traduce en beneficios para el hombre, debido a que evita el uso excesivo de abonos nitrogenados, lo que representa a su vez una disminución en los costos de producción, menor contaminación y preservación de los agrosistemas (Souza et al., 1997; Valera, 1997). Se tiene registro de que establece simbiosis con cinco especies de *Rhizobium*, sin embargo *R. etli* es la más predominante en México (Segovía et al., 1993; Souza et al., 1994; Eardly et al., 1995; Silva et al., 1999; 2003). En el laboratorio, *P. vulgaris* es nodulada por más especies de *Rhizobium* que en el campo, aunque lo hacen con cierto grado de eficiencia, por lo que el rango de hospedería puede depender de los cultivares probados y las condiciones

usadas en la experimentación. Tomando en cuenta las especies de rizobios con las que nodula *P. vulgaris*, se puede afirmar que es un hospedero promiscuo como otras leguminosas tropicales (Martínez et al., 1985; Bromfield y Barran, 1990). Sin embargo, se ha propuesto que en la naturaleza el frijol común tiene cierta preferencia por *R. etli* (Packovsky et al., 1984, Aguilar et al., 2001) y a su vez, preferencia por ciertos genotipos dentro de dicha especie (Souza et al., 1994; 1997; Silva et al., 1999; 2003).

Con la tecnificación de las prácticas de cultivo de frijol se ha optado por la selección de plantas arbustivas en monocultivo, Graham y Halliday (1976) establecieron correlaciones entre el hábito de crecimiento y su capacidad de fijar nitrógeno, encontrando que las plantas con hábitos trepadores (las usadas por lo general en cultivo tradicional) tienen una mayor actividad de fijación de nitrógeno. Las poblaciones de *Rhizobium* en los nódulos pueden estar determinadas por las condiciones ambientales o las prácticas agrícolas (Souza et al., 1997; Palmer y Young, 2000). El pH del suelo parece seleccionar el tipo de especies que serán exitosas en la nodulación (Anyango et al., 1995; Martínez-Romero et al., 1991). Además deben tomarse en cuenta otros factores, tal como lo es la concentración de fósforo, ya que éste limita la fijación de nitrógeno. También se ha observado que puede haber una influencia importante por parte del contenido de calcio y de nitrógeno en el suelo que puede disminuir la variación genética de las poblaciones simbióticas (McArthur et al., 1988). La fertilización química usada normalmente en los campos de cultivo disminuye la proporción de nódulos efectivos y la diversidad genética de las bacterias encontrada en estos (Caballero Mellado y Martínez Romero, 1999). Cabe señalar que las prácticas agronómicas tradicionales favorecen la fijación biológica de nitrógeno (Souza et al., 1997; Baudoin et al., 1997).

Se ha observado que las formas silvestres y domesticadas pueden llegar a ser sexualmente compatibles, y si además crecen dentro el rango de polinizadores y sus periodos de floración se sobrelapan al menos parcialmente, puede ocurrir

flujo genético entre ellos. Este flujo genético probablemente puede afectar la organización de la diversidad genética en la poza genética primaria de los cultivos (Harlan y de Wet 1971). Lo anterior puede incluir la reducción o el incremento de la diversidad genética de los parientes silvestres, la extinción de algunas poblaciones, y el desarrollo de nuevas y más agresivas hierbas (Papa y Gepts; 2003).

*P. vulgaris* es considerada como una especie predominantemente autopolinizada. A pesar de que la mayoría de los datos sugieren que tasas de entrecruzamiento por debajo del 5%, se han reportado tasas mayores (hasta 66.8% (Wells et al., 1998)) (Ibarra-Pérez et al., 1997). Varios autores (Debouck et al., 1993, Beebe et al., 1997) han documentado varios ejemplos de hibridación entre plantas de frijol silvestres y domesticadas basados en características morfológicas, bioquímicas, análisis de marcadores moleculares, así como observaciones fenotípicas en poblaciones silvestres. Además se ha observado que en el sistema de autocruza del frijol común, el flujo genético es suficiente para prevenir el aislamiento genético entre las formas silvestres y domesticadas, y que la selección parece ser el factor evolutivo más importante que mantiene la identidad de las poblaciones silvestres y domesticadas en situaciones simpátricas (Papa y Gepts; 2003).

### **1.3 La asociación leguminosa-bacteria.**

#### **1.3.1 El nódulo y el proceso de nodulación.**

La simbiosis rizobio-leguminosa comienza con dos organismos de vida libre y termina con una coexistencia celular íntima (Long, 2001). En condiciones normales, ni la leguminosa ni los rizobios son capaces por sí solos de fijar nitrógeno; sin embargo, la interacción entre ellos da lugar al desarrollo de la capacidad para fijarlo (Brock et al., 1996), proceso que ocurre dentro de los nódulos. La infección de los rizobios a la planta es un proceso de varios pasos que

se inicia con eventos de preinfección en la rizósfera. Los rizobios responden con quimiotaxis positiva a los exudados producidos por la raíz, moviéndose hacia sitios localizados de ésta. Los rizobios son atraídos por aminoácidos y exudados, como los flavonoides. Subsecuentemente, los rizobios se anclan en la superficie de la raíz, una vez ahí, provocan la ramificación y el encurvamiento de las raíces, las sustancias activas han sido identificadas como lipooligosacáridos, también llamados factores *Nod*. Estos factores son sintetizados por enzimas codificadas por varios genes de nodulación. En las leguminosas que se asocian con *Rhizobium*, la región más susceptible a la infección es la zona justo detrás de la zona del meristemo apical en el sitio de donde emergen los pelos radiculares. La mayoría de pelos radiculares jóvenes pueden ser encurvados lo suficiente para contener las células bacterianas en una bolsa de pared celular. Después de aprisionar a la bacteria, se forma una lesión local en la pared celular del pelo radicular por medio de la hidrólisis de dicha pared celular. Los rizobios penetran a través de las paredes hidrolizadas por medio de la invaginación de la membrana plasmática, la planta hospedera reacciona depositando nueva pared celular alrededor de la lesión para formar un tubo de crecimiento. El tubo es llenado con bacterias proliferantes rodeadas de una matriz con la cual se forma el canal de infección. Concomitantemente con la formación del canal de infección, las células corticales particulares se dividen para formar un primordio de nódulo y el canal de infección crece en dirección a ese primordio. En este punto existe una diferencia importante en el proceso de nodulación de las leguminosas. En el nódulo indeterminado se presenta un meristemo apical persistente, con el cual el nódulo va tomando una forma cilíndrica, constantemente se van agregando células nuevas en el extremo del nódulo; mientras este meristemo esté activo se liberarán rizobios desde el canal de infección (este tipo de nódulos se presenta por ejemplo en alfalfa y chícharo). En un nódulo determinado, el crecimiento y la función son procesos simultáneos. El meristemo del nódulo es inducido por la corteza de la raíz externa, y las bacterias son liberadas en células meristemáticas activas y cada célula hija recibe rizobios; este tipo de nódulos se presentan en el frijol. Se encuentra actividad meristemática por un periodo corto, después de divisiones

sucesivas, las células meristemáticas invadidas se diferencian simultáneamente para formar el tejido central fijador de nitrógeno (Rhijn et al., 1995). A continuación hay una diferenciación de las bacterias en bacteroides y es precisamente en este estado en el que los rizobios son capaces de fijar nitrógeno. En algunos casos los bacteroides pierden su capacidad de división, pero los nódulos mantienen rizobios no diferenciados en estado de latencia (Olivieri y Frank, 1994, Wang et al., 2001). Con esto se completa la formación de un nódulo en donde el amonio producido es liberado al citoplasma y transportado a otras partes de la planta (Fisher, 1994).

La ruta del proceso de infección va a depender de la planta hospedera, ya que la misma bacteria puede infectar distintas especies de plantas. Una leguminosa es infectada mediante el mismo mecanismo sin importar la bacteria. De la misma manera, el tipo de nódulo va a depender de la planta y no de la bacteria. Lo anterior indica que el hospedero posee la información genética para la infección y nodulación, mientras que el papel de la bacteria es el de activar el programa de desarrollo de los nódulos de la planta (Rhijn et al., 1995).

Los genes esenciales que poseen los rizobios para la infección y la formación de nódulos pueden ser divididos en dos clases. Una clase incluye varios juegos de genes involucrados en la formación de la superficie celular de la bacteria (como los que determinan la síntesis de exopolisacáridos (*exo*), lipopolisacáridos (*lps*), etc.). Mutaciones en esos genes afectan el proceso de infección en varios grados, como lo es la incapacidad de inducir la formación de canales de infección, lo que lleva a la formación de nódulos vacíos. No se ha tenido evidencia que los compuestos que forman la superficie celular sean determinantes para el rango de hospedería. La segunda clase de genes son los de nodulación (*nod* ó *nod*). La inactivación de estos genes llevan a distintos fenotipos en la planta como la ausencia de nodulación, nodulación tardía y cambios en el rango de hospedería. Muchos de estos genes parecen ser intercambiables para la función de la nodulación entre diferentes especies y biovariedades y son



designados como genes comunes *nod*. Otros genes *nod* se encuentran involucrados en la nodulación de hospederos específicos, por lo cual son llamados genes *hsn* (host specific nodulation). En la mayoría de especies de *Rhizobium* estudiadas, los genes *nod* se encuentran en grandes plásmidos que también contienen los genes para la fijación de nitrógeno *fix* y *nif*, este plásmido se denomina *pSym*, aunque en algunas especies (*Mesorhizobium loti*, *Azorhizobium spp.*) los genes relacionados a la simbiosis se encuentran en el cromosoma (Rhijn et al., 1995).

Se ha postulado que la asociación rizobio-leguminosa es mutualista ya que la planta recibe el amonio que es producido en el nódulo (lo cual puede representar una ventaja selectiva), mientras que la bacteria recibe una fuente de carbono así como un ambiente favorable. Sin embargo, aunque el beneficio para la planta resulta evidente, en muchos casos el beneficio directo para la bacteria no es del todo claro (Olivieri y Frank, 1994; Ford, 2000). La asociación leguminosa-bacteria, al no resultar obligatoria no constituye una relación de mutualismo en sentido estricto, sino más bien una relación de cooperación (Cheng, 1991).

Diversos estudios han mostrado que dentro de una misma especie de rizobios pueden existir diversos tipos de cepas, las cuales tienen distintas capacidades para fijar nitrógeno (Burgos et al., 1999; Vázquez Arroyo et al., 1998). De hecho, existen algunas cepas que pueden llegar a nodular, pero sin fijar nitrógeno en absoluto (Ford, 2000). Se ha observado en *Mesorhizobium* que lo anterior se encuentra relacionado con la presencia del plásmido *sym* y de la organización de la isla de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, algunos estudios sugieren que en los cultivos tradicionales, o bien en estado silvestre, las plantas hospederas presentan mecanismos que les permiten asociarse selectivamente con especies y linajes de rizobios que les proporcionen mayor beneficio y evitar nodular con aquellas que pudieran resultar parásitas. Por otra parte, también se debe considerar la posibilidad de que las bacterias pueden

presentar también una cierta selectividad por ciertos genotipos de plantas (Souza et al., 1997, Silva et al., 1999; Ford, 2000).

Del orden de las leguminosas, Fabales, el grupo Caesalpinioideae es el más primitivo, dentro éste se incluyen muchos géneros que no producen nódulos, lo anterior sugiere que la simbiosis fue desarrollada en una etapa relativamente tardía durante la evolución de las leguminosas. La simbiosis depende de características genéticas peculiares de las leguminosas, las cuales resultan tan complejas que raramente han evolucionado en otros grupos del reino vegetal (Rhijn et al., 1995).

## **1.4 Genética de poblaciones de *Rhizobium*.**

### **1.4.1 Diversidad genética de *Rhizobium*.**

Aunque las bacterias se reproducen asexualmente, son los seres vivos que presentan mayor variación genética (Eardly et al., 1995; Rocha, 1996), la cual se encuentra influenciada por factores ecológicos, eventos de recombinación, por las distintas fuerzas evolutivas, así como por una larga historia de existencia en el planeta. La clave 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 (mutación y recombinación) y los factores que subsecuentemente determinan su permanencia en las poblaciones (selección y deriva) (Nei y Kumar 2000). Tomando en cuenta lo anterior, es importante considerar los procesos evolutivos y ecológicos que pueden dar origen a tal variación. Además, hay que considerar que en el sistema que presenta la asociación rizobio-leguminosa, la planta puede jugar un papel preponderante en el modelado de la variación genética de las poblaciones

simbióticas de *Rhizobium* (Souza et al., 1994, Hagen y Hamrick, 1996; Silva et al., 1999).

La diversidad genética de rizobios aislados de *Phaseolus vulgaris* ha sido examinada a nivel mundial, tanto en los centros de domesticación como en áreas donde han sido introducidas, con una variedad de técnicas y criterios (Martínez Romero, 2003). Para el análisis de la diversidad genética en poblaciones de *Rhizobium* se ha usado extensivamente el análisis de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE, por sus siglas en inglés), también llamada isoenzimas, esta técnica permite observar los niveles de variación genética, así como el grado de similitud genética (Selander et al., 1986). Su principal suposición desde el punto de vista evolutivo es que los cambios en la movilidad de las enzimas reflejan cambios en las secuencias del ADN que codifica a estas enzimas (Pérez y Piñero, 1997). Sin embargo, cabe señalar que alrededor del 30% de los cambios en el ADN no afectan la secuencia de los aminoácidos de las proteínas y además se ha calculado que cerca de una tercera parte de las sustituciones de aminoácidos pueden ser electroforéticamente detectables (Ferguson, 1980), esto es debido a que la mayoría de las sustituciones en los aminoácidos no alteran la carga de la proteína (Selander y Levin, 1980). Sin embargo, las isoenzimas siguen teniendo ventajas, como lo es la relativa abundancia de loci polimórficos aún a nivel intraespecífico, e incluso se ha observado que los resultados obtenidos por esta técnica corresponden a los obtenidos por otras técnicas que utilizan ADN como lo es la hibridación total ADN-ADN, RFLP's y secuencias del gen 16S ribosomal .

Se ha reportado una gran diversidad genética para *R. etli* en México. Se han obtenido con isoenzimas valores de H > 0.6 y 1.3 o 1.1 cepas por genotipo (ET) (Souza et al., 1994; Caballero Mellado y Martínez -Romero, 1999; Segovia et al., 1991; Valera, 1997; Silva et al., 1998). Esta variación podría servir como base para la delimitación de especies, sin embargo, se ha observado que algunos aislados definidos como *R. etli* por MLEE han mostrado genes de otra especie (*Rhizobium leguminosarum*) en el gen 16S ribosomal (Eardly et al., 1995). La

transferencia horizontal de genes, así como recombinación cromosomal complica el establecimiento de límites entre especies, además de que esto puede ser la causa de los altos niveles de variación genética encontrados. En África y Europa se ha observado una diversidad genética menor en poblaciones de *R. etli* asociadas a frijol, sin embargo, esto puede ser debido al hecho de que las plantas fueron introducidas y se está observando un efecto fundador (Martínez-Romero, 2003). Harrison et al. (1989) reportan fuertes diferencias en las frecuencias de los genotipos más comunes en sus sitios de muestreo y esto lo explica de dos formas: a) Existe una fuerte presión de selección a favor de linajes particulares. b) Los niveles de recombinación entre poblaciones son bajos. Sin embargo, la primera opción parece ser la más consistente.

Estudios realizados con rizobios no simbióticos del suelo han mostrado también alta diversidad,  $H = 0.504$  (Segovia et al., 1991), además se encontró una proporción de un aislado simbiótico por cada 40 que no lo son en el suelo, esto sugiere la participación de linajes no simbióticos en la generación de nuevos linajes simbióticos con diferentes rasgos adaptativos. Si se considera lo anterior junto con lo postulado acerca de la capacidad de este grupo de bacterias para transmitir la información genética de la nodulación contenida en el plásmido *sym* (Wang et al., 2001; Sawada et al., 2003), se puede proponer que los rizobios no simbióticos son un reservorio de diversidad genética.

Aún cuando el tipo de reproducción de las bacterias sugeriría una estructura clonal de las poblaciones, se ha observado que la recombinación puede llegar a ser un evento frecuente, tanto así que puede llegar a romper con las estructuras clonales (Souza et al., 1992). Sin embargo, debido a que la reproducción es un proceso independiente del intercambio genético, éste se da por un proceso distinto de la recombinación recíproca (es decir, sexual como en eucariontes) (Dyhuinzen y Green, 1991). Por lo anterior todas las bacterias muestran un cierto grado de clonalidad, por la cual resulta importante conocer la magnitud y la frecuencia con la que ocurre el flujo genético y como está afectando la diversidad genética de las

poblaciones de rizobios (Souza et al., 1992). Sin embargo, no es trivial determinar si la estructura clonal se debe realmente a la estructura genética de la población o es un artefacto de la falta de conocimiento de los límites de la población, o bien, un producto de la selección natural contra los genotipos recombinantes (Souza et al., 1994).

La evaluación de la transferencia de genes es de vital importancia para poder evaluar la capacidad de las bacterias para adaptarse a nuevos ambientes (Vilas-Boas, 2002), ya que la transferencia de genes ecológicamente adaptativos permite la diversificación y especiación bacteriana, por lo que estos eventos tienen un gran impacto sobre las poblaciones de rizobios (Sawada et al., 2003).

Los análisis de desequilibrio de ligamiento pueden indicar la extensión en la cual las poblaciones exhiben una asociación no azarosa de los alelos en los loci. Esto, es un estimado de la cantidad de recombinación dentro y entre las poblaciones, pero además puede sugerir la existencia de selección que está manteniendo a ciertos genotipos (Souza et al., 1994; Silva et al., 1999). Las poblaciones de *Rhizobium* han mostrado estructuras poblacionales que van desde clonales hasta prácticamente panmícticas (Souza 1992 et al., Maynard Smith, et al., 1993). Silva et al. (1999) proponen una estructura reticulada para poblaciones de *R. etli* que nodulan con plantas cultivadas tradicionalmente, donde los eventos de recombinación ocurren entre las ramas principales (lo que es recuente dentro de ellos), sin embargo, en el momento de que un genotipo exitoso incrementa su frecuencia, la estructura se vuelve epidémica. Cabe señalar que en un estudio posterior, los dos linajes encontrados resultaron ser dos especies, *R. etli* y *R. gallicum*, en donde se observa que dentro de cada una de estas especies la recombinación es alta, aunque presentan una barrera reproductiva entre ellas siendo que coexisten en el suelo e incluso en los nódulos de una misma planta (Silva et al., 2003). A pesar del potencial de intercambio genético en bacterias, los procariontes forman grupos fenotípicos y genéticos discretos, los cuales conforman linajes genéticos coherentes (Maynard Smith et al. 1995; Cohan 1994)

#### 1.4.2 Efectos de la domesticación de *Phaseolus vulgaris* en la genética de poblaciones de *Rhizobium*.

Estudios de la genética de poblaciones de los rizobios han demostrado que el cultivo de frijol repercute en la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *R. etli* (Souza et al., 1994, 1997; Valera, 1997; Silva et al., 1999). Usualmente el proceso de domesticación erosiona la diversidad genética natural de los organismos bajo domesticación (Doebley, 1989; Escalante, 1994), tal es el caso de *P. vulgaris*, donde se ha observado alta endogamia y niveles bajos de diversidad (Escalante et al., 1994; Souza et al., 1997). En contraste, se ha encontrado menor variación genética en bacterias aisladas de nódulos obtenidos de plantas silvestres que la observada en nódulos de plantas domesticadas. (Souza et al., 1994). En plantas silvestres y de cultivo tradicional se ha encontrado una dominancia de genotipos bacterianos, lo cual sugiere que existe una adaptación tanto al suelo como a las distintas poblaciones de frijol, teniendo como consecuencia la disminución de la diversidad genética, mientras que en cultivos más tecnificados, el movimiento del suelo puede favorecer la migración de los genotipos teniendo menor diferenciación entre plantas, lo cual puede evitar la adaptación a condiciones locales (Souza et al., 1994; Silva et al., 1999).

Todo lo anterior indica que la diversidad genética de los rizobios asociados al frijol común puede estar determinada por las prácticas agrícolas, para lo cual se han propuesto dos hipótesis para explicar el fenómeno: a) Existe una mayor diversidad bacterias en el suelo de parcelas cultivadas que en el suelo silvestre, lo que permite a las plantas tomar bacterias de una poza génica mayor de genotipos. b) Las diferencias en la diversidad genética que presentan los rizobios simbióticos pueden deberse a cambios en la capacidad selectiva por parte de las plantas hacia genotipos bacterianos, lo cual puede estar asociado al proceso de domesticación. Esto es consistente por lo propuesto por Hagen y Hamrick (1996), en donde la selección genotipo específica entre el huésped y el hospedero, y los efectos fundadores de las bacterias de plantas individuales, son importantes en la

estructuración de las poblaciones, aunque la recombinación y la subsecuente competencia entre linajes pueden jugar también un papel importante. Resultados obtenidos por Silva et al. (1999) sugieren que el efecto fundador y la selección genotipo específica (por parte de la planta) son fuerzas importantes que dan forma a la estructura de la población de rizobios asociados a *P. vulgaris*.

### 1.4.3 Genética de poblaciones de *Rhizobium* y agronomía.

La introducción de inoculantes bacterianos en los cultivos ha sido una práctica empleada desde hace más de 100 años. Cuando se encuentran ausentes rizobios nativos, la inoculación mejora el crecimiento y la cosecha (Vlassak y Vanderleyden, 1997), pero se ha observado que cuando existen linajes nativos de bacterias en los campos de cultivo, probablemente compiten con el linaje inoculado, el cual ocupa una pequeña parte de los nódulos (Aguilar et al., 2001). La diversidad genética de *Rhizobium* puede estar influenciada por la recombinación entre bacterias locales e inóculos (Sullivan et al., 1995). Se ha propuesto que la baja efectividad en la simbiosis frecuentemente observada puede ser debida a una incompatibilidad entre ambos simbioses (Bernal y Graham, 2001).

Los diversos estudios han revelado que no existe un linaje de *Rhizobium* adaptable y eficiente único para todos los suelos, condiciones ambientales y genotipos de frijol. Los rizobios mejor adecuados bajo ciertas condiciones pueden ser reclutados en cada momento de la poza genética del suelo. La selección recurrente de *R. etli* bv. *phaseoli* en nódulos puede beneficiar a las bacterias mejor adaptadas en una región o cultivar, esto puede constituir las bases de la coevolución y resulta vital para lograr obtener inóculos eficientes (Martínez-Romero, 2003).

## 2 Zona de estudio

La zona de estudio comprende una región del Bajío mexicano que se localiza en la frontera de los estados de Michoacán y Guanajuato, cerca de los poblados de Yuriria y Jéruco (Fig. 1.)

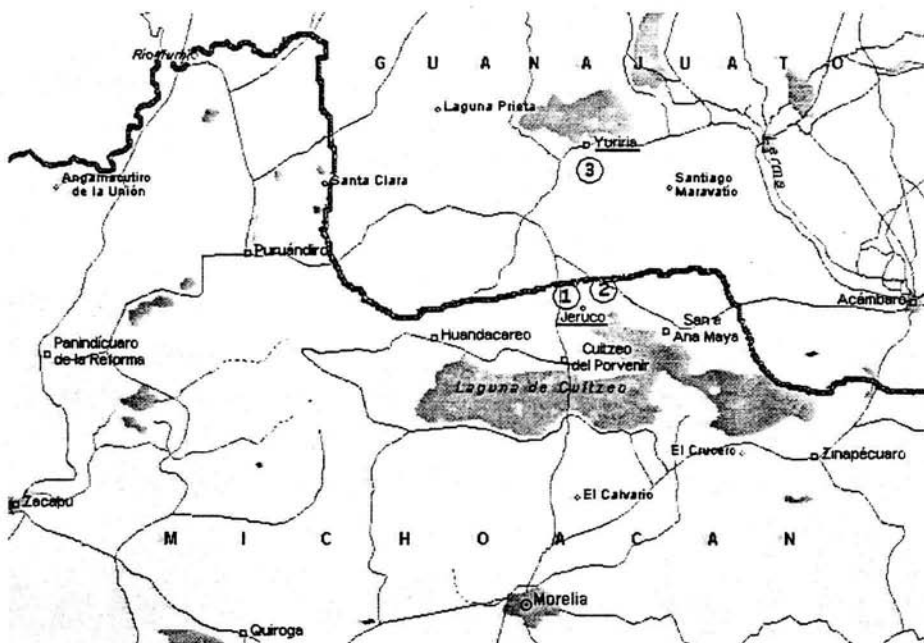


Figura 1. Mapa de la distribución de la zona de muestreo.

Los sitios de muestreo 1 y 2 que se encuentran al Sur, se localizan cerca del poblado de Jéruco, en las coordenadas  $19^{\circ}58'$  de latitud norte y  $101^{\circ}08'$  de longitud oeste, a una altura de 1,840 metros sobre el nivel del mar. Su hidrografía se constituye por el lago de Cuitzeo, así como arroyos temporales. El clima es templado con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 906.2 milímetros y temperaturas que oscilan de  $10.2$  a  $27.5^{\circ}$  C. Los suelos del lugar datan de los periodos cenozoico, cuaternario y plioceno; su uso es primordialmente agrícola y en menor proporción ganadero y forestal. Los



## 2 Zona de estudio

La zona de estudio comprende una región del Bajío mexicano que se localiza en la frontera de los estados de Michoacán y Guanajuato, cerca de los poblados de Yuriria y Jéruco (Fig. 1.)

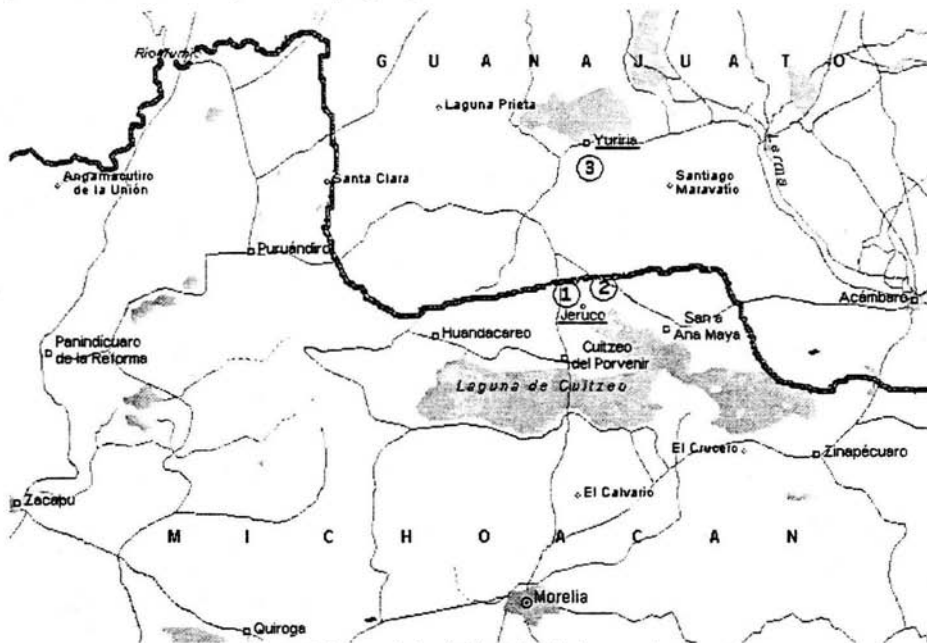


Figura 1. Mapa de la distribución de la zona de muestreo.

Los sitios de muestreo 1 y 2 que se encuentran al Sur, se localizan cerca del poblado de Jéruco, en las coordenadas  $19^{\circ}58'$  de latitud norte y  $101^{\circ}08'$  de longitud oeste, a una altura de 1,840 metros sobre el nivel del mar. Su hidrografía se constituye por el lago de Cuitzeo, así como arroyos temporales. El clima es templado con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 906.2 milímetros y temperaturas que oscilan de  $10.2$  a  $27.5^{\circ}$  C. Los suelos del lugar datan de los periodos cenozoico, cuaternario y plioceno; su uso es primordialmente agrícola y en menor proporción ganadero y forestal. Los

principales cultivos son el alfalfa, sorgo, frijol y garbanzo (<http://www.guanajuato.gob.mx/>, 2002).

El sitio de muestreo 3 se encuentra al Norte, cerca de la ciudad de Yuriria, Guanajuato, y está situada a los 100° 08' 19'' de longitud al oeste y a los 20° 12' 51'' de latitud norte. El territorio es montañoso y se caracteriza por ser de naturaleza volcánica. La parte más baja del mismo forma una ciénega inútil para la agricultura, pero que fue aprovechada para canalizar las aguas del río Lerma y dar ahí lugar a la laguna de Yuriria. La orografía tan accidentada presenta una altura promedio de 2,300 metros sobre el nivel del mar. El clima es semicálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura promedio es de 19.2°C. La precipitación total anual promedio es de 714 milímetros. Su vegetación comprende bosques de encino, mezquite y selva baja caducifolia. Los principales cultivos son maíz y frijol. De las 84 hectáreas sembradas durante el ciclo agrícola 1999-2000, el 100% eran de temporal, ya que el municipio no cuenta con superficie de riego por lo accidentado del terreno (<http://www.michoacan.gob.mx/>, 2002).

En cada uno de los sitios de muestreo se colectó un distinto tipo de planta que presentan distintas características morfológicas. En la parte Sur de la zona en la localidad de Jéruco, (Sitio 1), se colectaron plantas de *P. vulgaris* con características silvestres, al este, en la misma localidad, se colectaron plantas de cultivo que presentaron rasgos de plantas silvestres y plantas domesticadas (Sitio 2), mientras que en la región Norte, cerca de Yuriria (Sitio 3) se colectaron plantas de cultivo de *P. vulgaris* totalmente domesticadas (cultivares).

La distribución de los distintos tipos de plantas así como sus características, sugieren la existencia de un "wild-weedy-crop complex", el cual se ha observado previamente en México (Delgado Salinas et al., 1988; Papa y Gepts, 2003). En éste caso se encuentran cultivares con plantas silvestres simpátricas, teniendo como resultado de la cruce entre estos tipos de planta, híbridos que presentan características intermedias (tanto morfológicas, como bioquímicas y moleculares) entre las plantas silvestres y las domesticadas (Beebe, et al., 1997; Papa y Gepts,

2003). Se ha reportado que en el sistema de autocruza del frijol común, el flujo genético que tiene lugar es suficiente para prevenir el aislamiento genético entre las formas silvestres y domesticadas, y que la selección parece ser el factor evolutivo más importante que mantiene la identidad de las poblaciones silvestres y domesticadas en situaciones simpátricas (Papa y Gepts, 2003). Análisis similares entre materiales domesticados revelaron un menor nivel de introgresión posiblemente debido a la selección humana en contra de los híbridos y sugiere la ocurrencia de flujo genético asimétrico (Singh et al 1991; Gepts 1996; Papa y Gepts, 2003) muchas de esas observaciones fueron relacionadas con la identificación de poblaciones híbridas (Freyre et al., 1996; Beebe et al., 1997)

Las características que definieron a cada tipo de planta en el presente trabajo, así como la localidad donde se colectaron se presentan a continuación.

Sitio	Localidad	Tipo de planta	Características de las plantas
1	Jéruco	Silvestre	Las semillas son pequeñas, 5.35mm (+/-0.23). Las plantas son trepadoras y de crecimiento lento. Tallo muy delgado con hojas pequeñas. Puede presentar un mínimo grado de domesticación debido a un intercambio genético con plantas weedy.
2	Jéruco	Weedy (Silvestroide)	Resulta de la cruce entre plantas silvestres y cultivares, la semilla presenta en promedio un tamaño de 7.67mm (+/- 0.46mm), las plantas son de tamaño intermedio entre las silvestres y domesticadas.
3	Yuriria	Domesticado	Cultivares de la región sin evidencia de cruce con plantas silvestres, la semilla mide en promedio 10.81mm (+/-0.69mm). Las plantas presentan el crecimiento más rápido así como el mayor tamaño.

### 3 Objetivos

#### Objetivos generales

1. Determinar que especies de bacterias del género *Rhizobium*, asocian con *Phaseolus vulgaris* en diferentes tipos de planta, silvestre, weedy y domesticada.
2. Realizar un análisis comparativo a diferentes niveles de la estructura genética de las bacterias asociadas a *Phaseolus vulgaris* en los diferentes tipos de planta.

#### Objetivos particulares.

1. Obtener los estimados de diversidad y diferenciación genética de la población utilizando diferentes niveles jerárquicos.
2. Conocer las relaciones genéticas entre los aislados obtenidos.
3. Obtener valores de desequilibrio de ligamiento para conocer el grado de clonalidad de las cepas a analizar.
4. Inferir los procesos evolutivos que están ocurriendo en las poblaciones de bacterias que nodulan con *Phaseolus vulgaris* en la zona de estudio.

## 4 Método.

### Obtención de cepas.

En este trabajo se usaron cepas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología. La colecta fue realizada en 1998, entre los estados de Michoacán y Guanajuato (Fig.1), donde se colectaron en diferentes puntos, muestras de suelo y semillas de plantas de frijol silvestre, weedy y domesticado.

Las semillas y el suelo de cada lugar de colecta fueron transportados al invernadero del Instituto de Ecología, donde, en esterilidad, se germinaron las semillas con su respectivo suelo, y también se cultivaron plantas testigo con suelo estéril de las tres localidades. El sistema se mantuvo en esterilidad durante el tiempo suficiente hasta la formación de nódulos, los cuales fueron extraídos y tratados en el laboratorio (Anexo). En total se seleccionaron de 10 a 15 nódulos por planta y se aisló una cepa bacteriana por nódulo en medio PY incubándola a 30° C. Finalmente cada cepa se conservó en medio UL a -80 °C (Anexo).

### Restricción de enzimas del gen 16S ribosomal.

Para conocer qué especies de rizobios nodularon con *P. vulgaris*, se llevó a cabo la técnica de restricción enzimática del 16S ribosomal. El proceso comienza con la extracción del ADN de las células (Anexo), el ADN obtenido se cuantificó y se almacenó en alícuotas de 50 µl a -20 °C. Para la amplificación del gen 16S, se usaron los primers fD1 y rD1 (Weisburg et al., 1991), para lo cual se usaron las condiciones presentadas en el Anexo. Posteriormente los productos se cortaron con las siguientes enzimas de restricción: *Msp* I, *Pst* I y *Sau*3AI (Anexo). Estas enzimas se han usado previamente para la obtención de perfiles de restricción para la identificación de especies del género *Rhizobium* (Laguerre et al., 1994;

Silva et al., 2003). Finalmente los patrones de restricción para cada enzima se obtuvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Anexo); los patrones fueron comparados con patrones de las siguientes cepas de referencia:

*Rhizobium etli* CFN42

*Rhizobium etli* FNJ17

*Rhizobium gallicum* USDA 2918

*Rhizobium tropici* Tipo A CFN 299

*Rhizobium tropici* Tipo B CIAT 899

*Rhizobium galegae* CIAM 0703

*Sinorhizobium meliloti* USDA 1002

#### **Análisis de isoenzimas.**

Para analizar la estructura genética de las poblaciones de bacterias, se utilizó la técnica de electroforesis de isoenzimas en acetato de celulosa, para lo cual se extrajo de cada cepa su contenido celular soluble a partir de un cultivo en medio PY líquido (Anexo), éste fue dividido en alícuotas de 50 µl y almacenado a -20°C. El contenido celular soluble fue aplicado en acetatos de celulosa con el sistema de buffer TG y corrido a 190 V durante 14 minutos. Se obtuvieron los perfiles alélicos de las siguientes enzimas metabólicas: MDH, ME, IDH, PEP, PGM, G6PDH y XDH (Anexo), estas enzimas han sido identificadas como polimórficas para el género *Rhizobium* en otros estudios (Souza et al.; 1994; 1997; Valera, 1997, Silva et al., 1999). Cada patrón alélico se analizó de dos a tres veces con cepas que presentaran alelos similares, con el fin de corroborar los alelos obtenidos.

## Secuencias

Se obtuvieron las secuencias del gen 16S ribosomal, usando los mismos productos obtenidos con los oligonucleótidos que se utilizaron para la obtención del producto usado en la restricción enzimática, se eligieron 8 cepas a partir de los análisis de UPGMA de las isoenzimas, con el fin de confirmar la identidad de especies o linajes.

## Análisis de los datos.

Para el análisis de los datos de isoenzimas se utilizaron los programas ETDIV versión 2.2, ETMEGA versión 1.1, ETLINK versión 2.3 (Whittam, 1990), LDV (Nguyen, 1991) y MEGA versión 2.1 (Kumar et al., 2001) para calcular los siguientes parámetros:

Número de electrotipos (ETs), éste valor se refiere a la cantidad de ETs (genotipos) diferentes que existen en la muestra, los ETs compartidos muestran qué electrotipos se comparten entre subpoblaciones, linajes o especies.

Diversidad de ETs ( $H_x$ ), se define como la probabilidad de tomar dos cepas con ETs distintos en una población y en momento determinados y se calcula:  $H_x = (1 - \sum p_i^2) / (n/n-1)$  en donde  $p_i$  es la frecuencia de cada electrotipo y  $n$  es al número de cepas (Selander y Levin, 1980; Harrison et al., 1989).

Para conocer la diversidad y estructura genética de los rizobios, se calcularon las frecuencias alélicas para cada locus, a partir de estas se calcula la diversidad genética por locus  $h = 1 - \sum x_i^2 / (n/n-1)$ , donde  $x_i$  es la frecuencia del iésimo alelo en la población y  $n$  es el número de ETs (Selander et al., 1986), se define como la heterocigosis esperada dentro del equilibrio de Hardy Weinberg en una población panmíctica.

La diversidad genética de cada población ( $H_E$ ) se calcula  $H_E = (\Sigma h)/n$ , donde  $n$  es el número de locus y  $h$  la diversidad genética por locus (Selander et al., 1986), la cual representa la proporción de loci en la que dos ETs tomados sean diferentes por azar.

La diversidad genética promedio de las subpoblaciones ( $H_S$ ) que se define como el promedio de la diversidad genética de las subpoblaciones dentro de una población,  $H_S = (\Sigma H_E)/n$  donde  $n$  es el número de subpoblaciones.

La diversidad genética del total de las muestras de la población  $H_T$  se calcula por medio de  $H_T = (1 - \Sigma x_i^2)/(n/n-1)$ , donde  $x_i$  es el promedio de las frecuencias alélicas de un alelo en un locus dado (Nei, 1987).

La diferenciación genética se calcula usando  $G_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$ , este parámetro mide la cantidad proporcional de variación dentro de las poblaciones comparada con el total de la población. Este parámetro va de 0 a 1 en donde 0 indica que las subpoblaciones no muestran diferenciación genética y 1 que las subpoblaciones son totalmente diferentes. En el presente trabajo se hicieron análisis de diferenciación genética en distintas escalas jerárquicas (entre plantas de un mismo tipo, entre tipos de planta, así como entre ribotipos), estas variaciones del índice de diferenciación se han aplicado en varios estudios anteriores (Souza et al. 1994; Hagen y Hamrick, 1996; Valera, 1997; Silva et al., 1999). Para conocer si el valor obtenido de  $G_{ST}$  es significativamente distinto de cero, se aplicó una prueba de independencia de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ) de la siguiente manera:  $\chi^2 = nG_{ST}(a-1)$  donde  $n$  es el número de ETs y  $a$  es el número de alelos. Los grados de libertad se calculan mediante  $(k-1)(a-1)$  en donde  $k$  es el número de subdivisiones. La significancia fue considerada con  $p < 0.05$ .

El flujo genético entre poblaciones o subgrupos puede ser calculado substituyendo la  $F_{ST}$  de Wright por la  $G_{TS}$  de Nei en el modelo de flujo genético de islas en donde se substituye a  $4F_{ST}$  por  $2G_{ST}$ , ya que se trata de organismos



haploides, se calcula como  $Nm = (1-G_{ST})/2G_{ST}\alpha$ , en donde  $\alpha = (n/n-1)^2$  y  $n$  es el número de subpoblaciones. Este índice se refiere al número efectivo de genotipos migrantes por generación (Nei, 1973).

Para conocer las relaciones genéticas de las cepas basadas en los datos de isoenzimas se llevó a cabo un análisis de UPGMA (Sokal y Michener, 1958) y fueron representadas por medio de dendrogramas en donde se muestra la distancia genética de Nei (1978). Las relaciones genéticas de las cepas de cada tipo de planta, tomando a cada uno de éstos como población se llevó a cabo con el programa Popgene32 (Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997) mediante el método de UPGMA.

El coeficiente de desequilibrio de ligamiento entre el  $i$ ésimo alelo  $i$  en el locus  $j$  y el  $k$ ésimo alelo  $k$  en el locus  $l$  esta dado por  $D_{ikjl} = g_{ikjl} - p_{jil}p_{kjl}$ , donde  $g_{ikjl}$  es la frecuencia del genotipo haploide de dos locus y  $p_{jil}p_{kjl}$  es el producto de las frecuencias de los correspondientes alelos. Este coeficiente se estandariza dividiéndolo entre  $D_{max}$ , que es el valor máximo para  $D_{ikjl}$  dadas las frecuencias alélicas (Lewontin, 1964; Hedrick y Thompson, 1986), el coeficiente ya estandarizado se representa por  $D'$  y puede tener un valor de  $-1$  a  $1$ , sin embargo en el presente trabajo se reporta el valor absoluto en donde  $0$  indica panmixia y  $1$  clonalidad. La distribución de  $D'$  fue calculada con el programa ETLINK.

Un índice que resulta útil para determinar el desequilibrio de ligamiento multilocus en poblaciones haploides se basa en la distribución de diferencias entre pares de aislados entre todos los loci (Souza et al. 1992). El número promedio de diferencias para un número de loci, representa una medida de la diversidad alélica. El cociente  $V_O/V_E$  se usa para probar la existencia de desequilibrio de ligamiento multilocus (lo que reflejaría una estructura clonal o panmíctica) (Souza et al., 1992; Maynard et al., 1993), en donde  $V_O$  es la proporción de la varianza en las diferencias entre los de loci observadas en una muestra particular, mientras que  $V_E$  es la varianza en una muestra esperada la cual corresponde a una

población en equilibrio de ligamiento (Brown et al., 1980). Este cociente tiene un valor esperado de 1 en el caso de que no exista asociación entre loci, es decir, no se presenta desequilibrio de ligamiento. Para comprobar que el valor obtenido es significativamente distinto de 1 se realizó una simulación Monte Carlo con 1000 repeticiones. La significancia fue considerada con  $p < 0.05$ .

Para el análisis de secuencias se utilizó el programa MEGA 2.1, el dendrograma se generó usando el método de Neighbor-Joining con el modelo de Tamura-Nei (corrección gama = 0.2), para dar robustez a los datos obtenidos, adicionalmente se aplicó la prueba de Bootstrap con 1000 repeticiones. Las secuencias fueron previamente corregidas con el programa Bioedit 5.0.9 (Hall, 2001) y alineadas con el programa Clustal W.

## 5 Resultados

Se aislaron un total de 102 cepas de 26 plantas, en promedio 3.8 cepas por planta, de las cuales 47 cepas se aislaron de nódulos de plantas silvestres, 22 de nódulos de plantas weedy y 33 de nódulos de plantas domesticadas (Tabla 1). Las plantas testigo no presentaron nódulos, lo que indica que la técnica empleada para la obtención de cepas es confiable.

Tabla 1. Número de cepas y plantas de cada uno de los sitios de muestreo, así como el tipo de planta que se presentaron en cada uno de ellos.

Sitio	Tipo de planta	Número de plantas	Número de cepas
Jéruco 1	Silvestre	13	47
Jéruco 2	Weedy	5	22
Yuriria	Domesticado	8	33
Total		26	102

### 5.1 Patrones de restricción enzimática del gen 16S ribosomal.

Los perfiles de restricción de enzimas mostraron la presencia de dos patrones diferentes para la muestra (Fig. 2). Al comparar con los patrones de cepas de referencia, se observó que ambos corresponden a patrones que presentan cepas de referencia de la especie *Rhizobium etli*, aunque cabe señalar que uno de ellos es igual al patrón de la cepa de referencia *R. etli* CFN42 y el otro corresponde a la cepa de referencia *R. etli* FNJ17. Cabe señalar que los patrones de restricción de ambas cepas de referencia son idénticos para las enzimas *Msp* I y *Sau*3AI, sin embargo, la enzima *Pst* I no presentó el sitio de restricción en el patrón de la cepa de referencia FNJ17, por lo que la banda resultante es del mismo peso que la banda del producto sin restricción, de alrededor de 1360 pares de bases (Fig. 2).

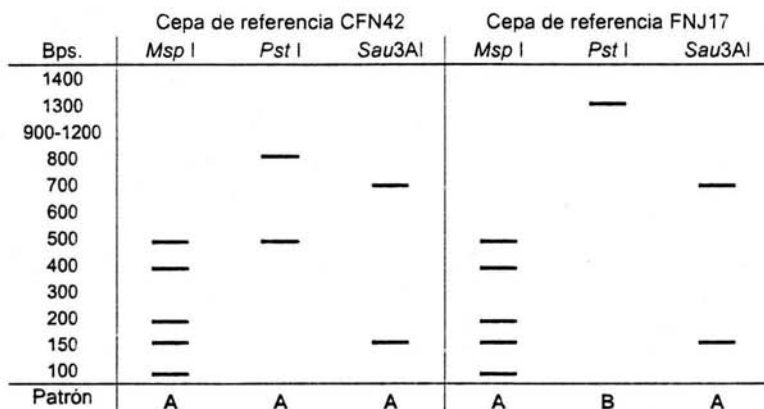


Figura 2. Representación esquemática de los patrones obtenidos mediante la restricción del producto del gen 16s ribosomal con las enzimas *Msp* I, *Pst* I y *Sau*3AI para las cepas de referencia usadas para la determinación de especies. En la parte inferior se presentan letras que fueron asignadas al patrón de cada enzima de restricción. Se observa una diferencia en el patrón de la cepa de referencia FNJ17 en la enzima *Pst*I, con respecto al patrón de la cepa de referencia CFN42.

Aunque los dos patrones que se encontraron pertenecen a la especie, *R. etli*, los resultados muestran que existe un polimorfismo en el gen 16S ribosomal, lo cual puede sugerir la existencia de dos grupos genéticos de la misma especie, sin embargo, para poder afirmar con seguridad lo anterior se necesitan considerar más evidencias, por lo que las cepas pertenecientes a cada patrón de restricción se les llamará ribotipos. Para distinguir las cepas que presenten el patrón de restricción de la cepa tipo CFN42 se les nombrará R-1 (patrón AAA), mientras que las cepas que correspondan al patrón de la cepa tipo FNJ17 se les llamará R-2 (patrón ABA).

Una vez definida la especie, así como los ribotipos encontrados, se obtuvieron las frecuencias alélicas, a partir de las cuales se calcularon los distintos parámetros genéticos mencionados en los métodos. Es importante señalar que el presente análisis fue llevado a cabo tomando en cuenta varios niveles jerárquicos, teniendo a la muestra total dividida por los tipos de planta, también se tiene el nivel

de planta, en donde se toma en cuenta a cada planta con sus respectivos aislados como unidad de análisis. Al final de esta sección se presenta un análisis considerando además a los dos grupos formados por los ribotipos de los patrones de restricción del gen 16S, por lo que los aislados de cada uno de los tipos de planta puede ser dividido a su vez por dichos grupos. Por último, se presenta un análisis de las secuencias del mismo gen.

## 5.2 Diversidad y estructura genética.

La electroforesis de isoenzimas mostró un total de 14 loci con 54 alelos en total, cada locus mostró en promedio 3.86 alelos (Tabla 2). En total se encontraron 88 ETs, de los cuales 12 ETs son compartidos entre los aislados de la muestra total, pero además se presentaron 2 ETs compartidos entre los aislados de los tres tipos de planta. Del total de los ETs compartidos el 79 % lo comparten solamente dos aislados, mientras que el 21 % tres o más.

En primer lugar se obtuvieron para los aislados de cada tipo de planta los parámetros básicos como número de ETs, diversidad de ETs ( $H_x$ ), porcentaje de loci polimórficos y promedio de alelos por locus. En la tabla 2 se observa que el mayor número de ETs se encuentra en el grado silvestre (sin embargo, éste es también el que mayor número de cepas tiene), para  $H_x$  se observan valores similares para las cepas del grado silvestre y domesticado, tienen el mismo porcentaje de loci polimórficos, aunque su promedio de alelos por locus es muy diferente. Aún cuando los aislados de plantas domesticadas tienen pocos alelos por locus, estos son muy diversos, sobre todo al comparar los valores obtenidos para los aislados "weedy".

Tabla 2. Medidas del número de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos, así como diversidad y número de genotipos, obtenidos con la técnica de electroforesis de isoenzimas, para cada tipo de planta y el total de la muestra.

Tipo de planta	N	Número de ETs	Diversidad de ETs $H_x$	% de loci polimórficos	Promedio de alelos por locus
Silvestre	47	45	0.976	93	3.57
Weedy	22	21	0.948	86	2.93
Domesticado	33	32	0.967	93	2.93
<b>Total muestra</b>	<b>102</b>	<b>88</b>	<b>0.987</b>	<b>93</b>	<b>3.86</b>

La diversidad genética ( $H_E$ ) para la muestra en total fue de 0.489 (S.E.=0.058), este nivel de diversidad se encuentra dentro de los niveles reportados para la especie (Souza et al., 1994; Valera, 1997; Silva et al., 1999). Los parámetros de diversidad genética ( $H_E$ ) para cada tipo de planta, así como la diversidad promedio ( $H_S$ ) y la diversidad total ( $H_T$ ) de la muestra dividida por los tipos de planta se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de diversidad y diferenciación genética para la muestra subdividida por los distintos tipos de planta por localidad. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

Tipo de planta	$H_E$	$H_S$	$H_T$	$G_{ST}$
Silvestre	0.511 (0.059)	0.433	0.478	0.073**
Weedy	0.420 (0.057)			
Domesticado	0.397 (0.053)			

\*\* Valor significativamente distinto de 0 ( $p < 0.001$ ).

El mayor valor de diversidad genética ( $H_E$ ) se presentó en las cepas silvestres, mientras que el menor en las cepas domesticadas, en donde se observa una aparente tendencia a disminuir según las aumentan las características de domesticación (Fig. 3). Usando una prueba de t pareada, el valor de  $H_E$  de las cepas de plantas domesticadas resultó estadísticamente diferente al valor obtenido de las plantas domesticadas, sin embargo los valores de  $H_E$  entre las cepas de plantas weedy y domesticadas no presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

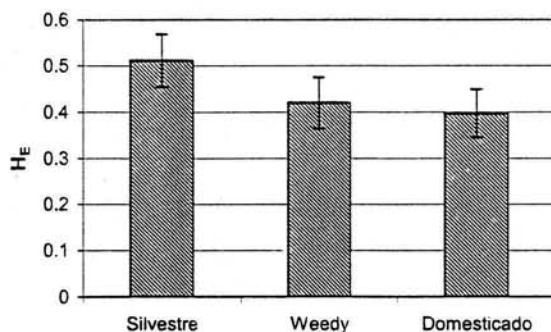


Figura 3. Comportamiento de la diversidad genética ( $H_E$ ) para cada tipo de planta en la muestra total.

Por su parte, el nivel de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) es significativo (Tabla 3), aunque puede estar influenciado por la cercanía de geográfica del lugar de muestreo de los aislados de plantas silvestres y weedy, para lo cual se realizó una análisis de diferenciación pareado entre los aislados de cada tipo de planta (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis pareado de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) entre los aislados de los distintos tipos de planta. Debajo de la diagonal se encuentra el número de ETs compartidos entre los tipos de plantas.

	Silvestre	Weedy	Domesticado
Silvestre	–	0.067**	0.082**
Weedy	2	–	0.013 <sup>y</sup>
Domesticado	2	4	–

\*\* Valor significativamente distinto de 0  $p < 0.001$ .

<sup>y</sup> Valor no significativamente distinto de 0

El valor de  $G_{ST}$  entre los tipos de plantas fue mayor entre las cepas silvestres y domesticadas, sin embargo, llama la atención que no resultó significativo entre los aislados weedy y domesticados (no están diferenciados genéticamente), y el valor de  $G_{ST}$  entre los silvestres y weedy es relativamente alto aún cuando el sitio de muestreo es muy cercano. Por su parte, se comparten más ETs entre los weedy y domesticados, sin embargo el número es muy reducido

para poder hacer alguna inferencia, aunque bien pueden reflejar lo obtenido en la diferenciación genética.

Por último, los análisis se llevaron a cabo tomando en cuenta a la planta hospedera dentro de cada localidad como unidad de análisis dentro de cada tipo de planta, los valores obtenidos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de diversidad genética promedio y total así como la diferenciación genética dentro considerando a las plantas hospederas como unidad de análisis dentro de cada uno de los diferentes tipos de planta.

Tipo de planta	$H_S$	$H_T$	$G_{ST}^{\text{®}}$
Silvestre	0.460	0.504	0.086 <sup>y</sup>
Weedy	0.411	0.422	0.024 <sup>y</sup>
Domesticado	0.386	0.387	0.003 <sup>y</sup>

® Diferenciación genética entre plantas.

<sup>y</sup> Valor no significativamente distinto de 0.

Las cepas de las plantas domesticadas presentaron los valores de diversidad más bajos, mientras que las silvestres presentaron el más alto, la diferencia es más grande en el valor de  $H_T$ . Por su parte, los valores de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) muestran que no existen diferencias genéticas entre las cepas aisladas de las plantas de cultivo. Es posible que el número de aislados por planta haya influenciado la significancia de  $G_{ST}$ , debido a su número tan reducido, sin embargo, los valores obtenidos pueden dar un panorama de los niveles de diferenciación genética entre plantas, aunque hay que tomarlos con muchas reservas. Es notorio que los aislados de plantas silvestres presentaron los valores de diferenciación genética más altos en todas las jerarquías del análisis (aunque a nivel de planta no resultó significativo).



### 5.3 Flujo genético.

Juntos, los aislados de los tres tipos de plantas presentaron entre ellos un número de genotipos migrantes por generación ( $N_m$ ) de 2.821, mientras que entre los aislados de plantas silvestres y weedy es de 1.74 y entre silvestre y domesticado es 1.39, en el caso de weedy y domesticado, el valor de  $G_{ST}$  no fue significativo (Tabla 4), por lo que no se estimó el valor de  $N_m$ . En los casos silvestre-weedy y silvestre-domesticado,  $N_m$  resultó baja, lo cual resulta interesante ya que en términos de flujo genético sería más plausible esperar mayor flujo (o en este caso mayor número de migrantes) en poblaciones más cercanas, como ocurre entre silvestres y weedy. Sin embargo, el nivel de  $G_{ST}$  fue entre weedy y domesticados no es significativo, lo cual indica que las poblaciones no están estructuradas. Esto puede sugerir flujo genético continuo, aunque es conveniente esperar al análisis de desequilibrio de ligamiento para poder hacer afirmación alguna, ya que pueden existir varias razones además del flujo genético que pueden estar afectando la diferenciación genética, tal como lo es la selección natural, la recombinación, o tasas de mutación diferenciales en cada sitio de muestreo.

### 5.4 Relaciones genéticas.

Las relaciones genéticas basadas en los datos de isoenzimas se presentan por medio de un dendrograma generado con el método de UPGMA para toda la muestra (Fig. 4) Los números ahí presentados corresponden al número de la colección del cepario de Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM.

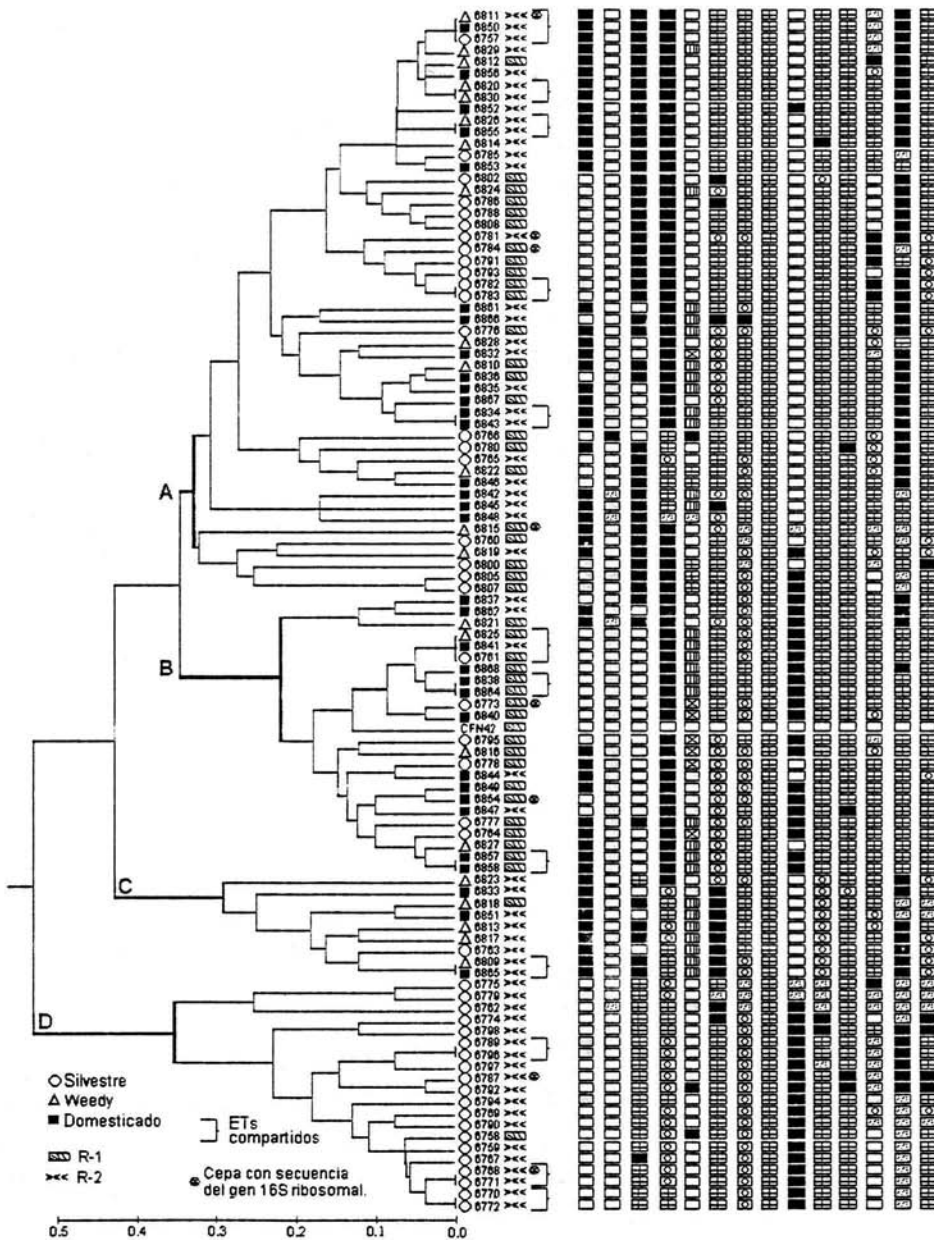


Figura 4. Dendrograma de las relaciones genéticas basadas en los datos de electroforesis de isoenzimas de la muestra total, obtenido por el método de UPGMA. Se muestra el tipo de planta, las cepas que comparten ETs, el ribotipo del análisis del gen 16S, así como las cepas secuenciadas para este gen. En la parte derecha de la figura se esquematizan los genotipos de cada cepa para cada uno de los loci. Los números corresponden al cepario del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM.

En la figura anterior se muestran las relaciones genéticas del total de los aislados analizados, señalando tanto el tipo de planta (triángulo, círculo y cuadrado) así como el ribotipo al que pertenece cada cepa (rayado R1 y ><< R2). Adicionalmente se presenta por medio de símbolos al genotipo de los 14 loci analizados, para cada uno de los aislados.

En principio se puede observar que los aislados se agrupan en 4 clados principales formados a distancias mayores a 0.32. Cabe señalar que a distancias más pequeñas también pueden formarse pequeños grupos coherentes, aunque para el análisis esto puede resultar impráctico. El clado A es el más grande y en él se observa una heterogeneidad en lo que a tipo de planta se refiere. Por su parte, el clado B presenta una predominancia de cepas de plantas domesticadas, además ahí se encuentra la cepa tipo CFN42. En el clado C se encuentran cepas de los tres tipos de planta. Por último, el clado D es el que se encuentra más alejado de los otros tres, y además agrupa únicamente a cepas silvestres.

Los genotipos de los loci analizados permiten observar la presencia de alelos que forman los clados, con lo anterior se puede inferir la asociación de alelos, lo que puede producir desequilibrio de ligamiento dentro y entre grupos. Cuando se observan líneas continuas de un alelo asociado a otro sugiere clonalidad, mientras que cuando estos continuos se rompen y forman mosaicos, indica recombinación.

#### **5.4.1 Relaciones genéticas entre aislados de los distintos tipos de planta.**

Para conocer que tan relacionados genéticamente se encuentran los aislados de cada tipo de planta, se realizó un análisis considerando a cada grupo

de aislados de cada tipo de planta como población, usando el método de UPGMA (Fig. 5).

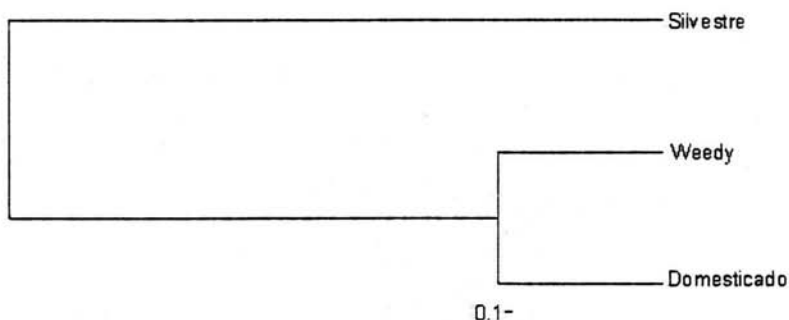


Figura 5. Dendrograma de los aislados de los tipos de planta agrupados como poblaciones independientes, generado por el método de UPGMA, con la distancia genética de Nei (1973).

En esta figura se corrobora lo obtenido con los datos de diferenciación genética: los aislados weedy y domesticados, se encuentran más relacionados genéticamente (y por lo tanto menos diferenciados), aún cuando esto no corresponda a la separación geográfica. Lo anterior sugiere que el proceso de domesticación de las plantas está influenciando en gran medida a los genotipos de rizobios que se están asociando con *P. vulgaris* en la zona de estudio.

## 5.5 Análisis de desequilibrio de ligamiento.

Para el análisis de desequilibrio de ligamiento se consideraron los mismos niveles jerárquicos (exceptuando entre plantas), pero adicionalmente se utilizaron los grupos formados por el análisis de UPGMA para todas las muestras (Fig. 4), esto con el fin de identificar hasta que grado los grupos formados presentan asociaciones no azarosas de alelos, con lo que se podría inferir la presencia de recombinación.

Debido a que la prueba de  $D'$  es sensible al tamaño de muestra, la distribución de  $D'$  sólo se obtuvo para la muestra total, esto se muestra en la figura 6.

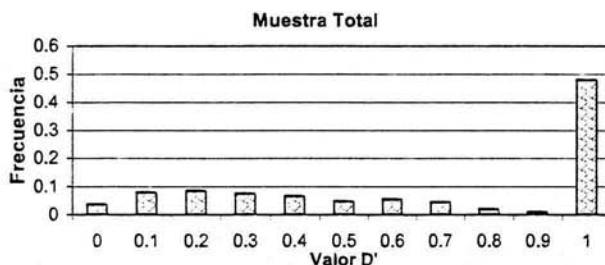


Figura 6. Valores de distribución de  $D'$  de la muestra total. El Eje X presenta los valores de  $D'$ , mientras en el eje Y se presentan sus frecuencias.

La distribución de  $D'$  en la muestra total indica que la población muestreada de rizobios presentan una estructura clonal, pero con algunos loci recombinantes. Sin embargo los datos anteriores de  $N_m$  muestran evidencia de flujo genético, esto sugiere que puede existir flujo genético sin recombinación, o tal vez en niveles tan bajos que no rompen con esa estructura clonal. Hay señalar que bastan pocos genes que recombinen en cada generación (tasa mayor a  $10^{-6}$ ) para cambiar la estructura poblacional, lo que incrementa el tamaño efectivo y permite que actúe la selección natural a nivel loci. Esto puede ocurrir aunque la recombinación no sea suficientemente frecuente para romper con la estructura clonal.

Los valores del índice  $V_O/V_E$  obtenidos en los tipos de planta, así como para la muestra total se presentan en la Tabla 6. Tanto los tipos de planta así como la muestra total presentaron desequilibrio de ligamiento significativo. El valor más alto lo presentan las cepas silvestres, lo cual indica que son las que tienen menores niveles de recombinación. Los aislados weedy y domesticados muestran valores muy similares, esto resulta peculiar, ya que los ambientes en donde se encuentran ambos tipos de planta son distintos, aunque esto también habla de la diferencia

entre el ambiente silvestre y aquellos donde se presenta algún grado de domesticación.

Tabla 6. Valores de  $V_O/V_E$  tanto para los aislados como para los ETs, considerando la muestra total y los distintos tipos de planta.

	Silvestre		Weedy		Domesticado		Total muestra	
	Cepas	ETs	Cepas	ETs	Cepas	ETs	Cepas	ETs
$V_O/V_E$	2.141*	2.114*	1.640*	1.521*	1.638*	1.596*	2.079*	1.996*

\* Valor significativamente distinto de 1  $p < 0.001$

El hecho de que los valores de ETs y cepas sean similares indica que en la muestra no se encontraron genotipos sobrerrepresentados, los cuales podrían afectar los estimados de desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, si el desequilibrio de ligamiento de las cepas fuera mayor que el de los ETs se debería a una estructura epidémica, en donde la sobrerrepresentación de unos pocos ETs puede dar una falsa señal de recombinación.

También se llevó a cabo un análisis pareado similar al realizado con  $G_{ST}$  entre los aislados de los distintos tipos de planta (Tabla 7), con el fin de saber si comparten un acervo genético.

Tabla 7. Valores pareados de  $V_O/V_E$  entre los distintos tipos de planta, sobre la diagonal se encuentran los valores para los aislados, mientras que de bajo se presentan los valores para los ETs.

Tipo de planta	Silvestre	Weedy	Domesticado
Silvestre	--	2.131*	2.063*
Weedy	2.054*	--	1.65*
Domesticado	2.005*	1.497*	--

\* Valor significativamente distinto de 1  $p < 0.001$

Se observa que el nivel más bajo, aunque significativo, de desequilibrio de ligamiento se presenta entre los aislados domesticados y weedy, lo que da una prueba más de las similitudes que presentan los aislados de estos tipos de planta.

En el caso de los grupos (o clados) del dendrograma de la figura 4, se observan diferencias entre los valores de desequilibrio multiloci de los clados A,

B y C (Tabla 8). El clado que A está subdividido en más de 4 grupos discretos (ver Figura 4) dentro de los cuales se presenta un cierto grado de clonalidad, las diferencias entre estos grupos es el origen del valor significativo de desequilibrio de ligamiento. Por su parte, en los clados B y C no se presenta desequilibrio de ligamiento significativo, lo cual sugiere que estas cepas pueden estar teniendo niveles de recombinación dentro de los clados que llegan a romper con la estructura clonal de estas bacterias. En el caso del clado D (el cual contiene únicamente aislados silvestres), se presenta el valor de desequilibrio de ligamiento más alto de los clados, pero es menor que el valor de las cepas silvestres en total (Tabla 6). Esto se debe a que las plantas silvestres están nodulando con cepas del clado D que son clonales, así como con cepas de los demás clados; aumentando con esto la el valor de desequilibrio de ligamiento. Esto no ocurre con las cepas de plantas weedy y domesticadas, donde los valores se encuentran dentro del rango correspondiente al clado A donde existe una mezcla de todos los tipos

Tabla 8. Valores de  $V_O/V_E$  para los grupos del dendrograma de la Fig. 7.

	Clado A		Clado B		Clado C		Clado D	
	Cepas	ETs	Cepas	ETs	Cepas	ETs	Cepas	ETs
Valor de $V_O/V_E$	1.468*	1.324*	1.160 <sup>§</sup>	0.974 <sup>§</sup>	1.087 <sup>§</sup>	0.886 <sup>§</sup>	1.797*	1.588*

\* Valor significativamente distinto de 1  $p < 0.001$

<sup>§</sup> Valor no significativo de 1  $p > 0.05$

Debido a que el clado D resultó el grupo más alejado en el análisis de relaciones genéticas, se llevó a cabo un análisis comparando a los demás grupos entre ellos y con el mismo clado D (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de desequilibrio de ligamiento para los clados A, B y C juntos, así como para cada uno de estos junto con el clado D. Únicamente se presentan los valores obtenidos para los ETs.

	Clados ABC	Clados AD	Clados BD	Clados CD
Valor de $V_O/V_E$	1.503*	2.300*	3.017*	3.051*

\* Valor significativamente distinto de 1  $p < 0.001$

Aún cuando todos los valores de  $V_0/V_E$  resultaron significativos, se notan grandes diferencias, en principio el valor para los clados A, B y C baja considerablemente en comparación del valor para toda la muestra, mientras que los clados agrupados B, D y C, D, presentan los niveles más altos de desequilibrio de ligamiento encontrados en este trabajo. Lo anterior sugiere que para la muestra total, el clado D es la mayor fuente de desequilibrio de ligamiento.

### 5.6 Análisis de los datos considerando a los ribotipos como grupos genéticos.

A partir de este punto se consideraron a los ribotipos obtenidos por el análisis de los patrones de restricción del gen 16S como posibles grupos genéticos. En principio, se observa que existe una mayor proporción de cepas pertenecientes al grupo R-2 en el total de cepas obtenidas (Fig. 7).

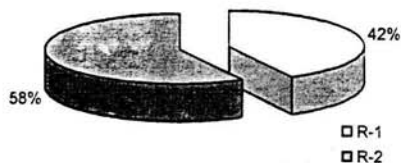


Figura 7. Porcentaje de los patrones de restricción encontrados en el total de la muestra.

Si se consideran los tipos de planta se observó que el porcentaje de cepas del grupo R-2 aumenta en los aislados de *P. vulgaris* silvestre (Fig. 8).



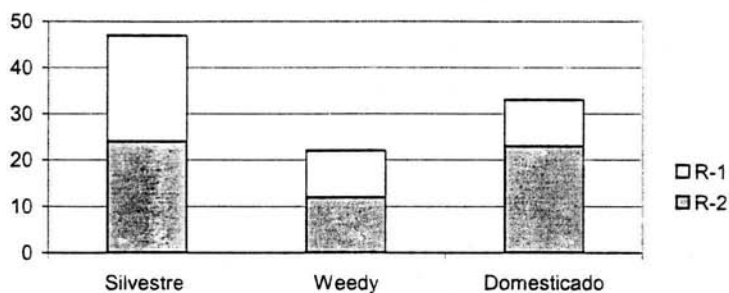


Figura 8. Proporción de cepas pertenecientes a cada patrón de restricción en los distintos tipos de plantas.

Para los análisis de diversidad genética se consideraron además de las divisiones de los tipos de plantas, se tomaron en cuenta los ribotipos, por lo que se puede subdividir la muestra total entre los ribotipos, pero a su vez cada uno de los tipos de planta puede ser igualmente dividido. En la figura 9 se representan cada una de las subdivisiones para el análisis.

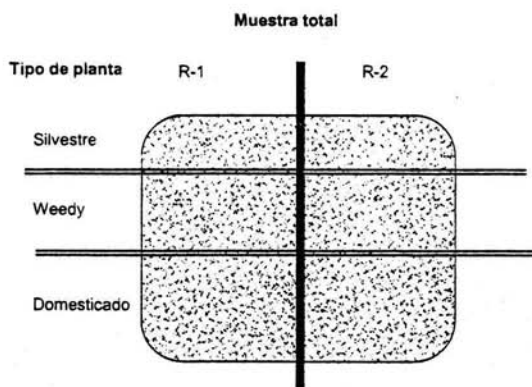


Figura 9. En la figura se representan las jerarquías en las cuales se llevó a cabo el análisis, en donde se tiene la muestra total, la cual se divide en dos patrones de restricción (línea gruesa), y además en tres tipos de plantas (líneas delgadas) es importante resaltar que cada uno de los patrones de restricción también está subdividido por los tipos de planta.

Considerando los grupos R-1 y R-2, se observan 40 ETs para el grupo R-1 y 54 para el grupo R-2 (Tabla 10), además se encontró la existencia de un ET

compartido entre los ribotipos. Cabe señalar que los ETs compartidos dentro y entre los grupos pertenecen a cepas extraídas tanto de la misma planta como de diferentes plantas.

Tabla 10. Medidas del número de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos, así como diversidad y número de genotipos, obtenidos con la técnica de electroforesis de isoenzimas, tomando en cuenta el tipo de planta y el grupo genético.

Grupo	Tipo de planta	N	Número de ETs	Diversidad de ETs $H_x$	% de loci polimórficos	Promedio de alelos por locus
R-1	Silvestre	23	22	0.953	93	3.07
	Weedy	10	10	0.867	86	2.43
	Domesticado	10	8	0.884	64	1.71
	<b>Total grupo</b>	<b>43</b>	<b>40</b>	<b>0.971</b>	<b>93</b>	<b>3.47</b>
R-2	Silvestre	24	21	0.923	93	3.21
	Weedy	12	11	0.894	79	2.14
	Domesticado	23	22	0.951	93	2.79
	<b>Total grupo</b>	<b>59</b>	<b>54</b>	<b>0.973</b>	<b>93</b>	<b>3.71</b>

Se puede observar que el valor de  $H_x$  resulta prácticamente igual e igual en el caso del porcentaje de loci polimórficos para los dos grupos, siendo que existen diferencias tanto en el número de cepas como en ETs aunque, el promedio de alelos por locus en el grupo R-2 es un poco más alto. Hasta este punto los grupos no muestran diferencias considerables, al menos en estos parámetros (Tabla 10).

Con la división de los ribotipos del gen 16S, fue posible obtener los valores de diversidad genética promedio ( $H_s$ ) 0.482 y de diversidad genética total ( $H_T$ ) 0.495. Con estos parámetros se obtuvo un valor de  $G_{ST}$  0.026, el cual es significativo ( $p < 0.0001$ ), esto implica que los ribotipos, como grupos genéticos, están poco diferenciados entre ellos. Al comparar con valores de  $G_{ST}$  obtenidos entre los tipos de planta se muestra que la domesticación de las plantas está teniendo mayor impacto en la estructuración de la población simbiótica de *R. etli* que la influencia de los posibles grupos genéticos que forman los ribotipos.

Ahora bien, si consideramos a los tipos de planta subdivididos por los ribotipos se pueden obtener los mismos parámetros, los cuales reflejarán la influencia diferencial de tipos de planta sobre los grupos mencionados (Tabla 11).

Tabla 11. Valores de diversidad y estructura genética de los tipos de planta subdividido por los ribotipos.

Tipo de planta	H <sub>S</sub>	H <sub>T</sub>	G <sub>ST</sub> <sup>@</sup>
Silvestre	0.443	0.503	0.118**
Weedy	0.412	0.422	0.025 <sup>y</sup>
Domesticado	0.355	0.371	0.045 <sup>y</sup>

<sup>@</sup> Valor de diferenciación entre ribotipos dentro de un mismo tipo de planta.

\*\* Valor significativo  $p < 0.001$ .

<sup>y</sup> Valor no significativo

El grado silvestre presenta el único valor de diferenciación significativo entre los ribotipos, esto puede explicar el alto nivel de diversidad genética (H<sub>E</sub>) encontrado en los aislados de ese tipo de planta.

Adicionalmente, para cada grupo se calcularon los mismos parámetros genéticos, pero en este caso los patrones de restricción fueron divididos por los diferentes tipos de plantas. La diversidad genética promedio (H<sub>S</sub>) y total (H<sub>T</sub>) para cada grupo se presentan en la Tabla 12. En la misma tabla se presenta la diversidad genética (H<sub>E</sub>) para tipo de planta de cada grupo.

Tabla 12. Índices de diversidad y diferenciación genética para los ribotipos subdivididos por los tipos de planta.

Grupo	Tipo de planta	H <sub>E</sub>	H <sub>E</sub> por grupo	H <sub>S</sub> por grupo.	H <sub>T</sub> por grupo.	G <sub>ST</sub>
R-1	Silvestre	0.453	0.444	0.403	0.428	0.059**
	Weedy	0.456				
	Domesticado	0.262				
R-2	Silvestre	0.415	0.497	0.409	0.494	0.171**
	Weedy	0.346				
	Domesticado	0.407				

\*\* Valor significativo  $p < 0.001$ .

Un dato interesante obtenido a partir de la subdivisión de la muestra en los ribotipos es el comportamiento de  $H_E$ , ya que en la muestra total se observa una disminución de  $H_E$  con los aislados de plantas domesticadas (Fig. 3), mientras que en este caso el ribotipo R-1 disminuye  $H_E$  en este tipo de planta, y la diversidad genética en el ribotipo R-2 aumenta (Fig. 10). Además se observa que la diferenciación genética es mucho más alta para el grupo R-2 (Tabla 12), lo cual podría sugerir que la domesticación de las plantas hospederas está teniendo efectos distintos en cada grupo. Sin embargo, el valor de  $G_{ST}$  entre los ribotipos en el grado silvestre resultó no significativo; esto resulta un tanto paradójico, ya que las diferencias de  $H_E$  entre los grupos este tipo de planta resultaron las más altas. Esto puede sugerir que el efecto diferencial observado puede deberse más al tamaño de muestra que a diferencias propias de los ribotipos.

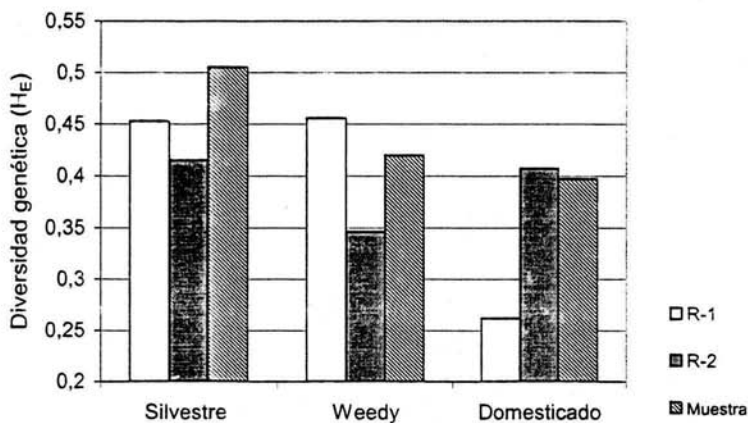


Figura 10. Comportamiento de la diversidad genética ( $H_E$ ) en cada tipo de planta, para la muestra total así como subdividida por los ribotipos.

Cabe señalar que debido a que más del 75% de las plantas presentaron en sus distintos nódulos a cepas de ambos ribotipos, no fue posible hacer una subdivisión de patrones de restricción, además la mitad de las plantas que presentaron un grupo tuvieron un sólo nódulo.

El valor de diferenciación genética obtenido entre los patrones de restricción fue muy bajo ( $G_{ST} = 0.026$ ), lo cual da como resultado un número de genotipos migrantes ( $N_m$ ) 4.682, esto puede sugerir que existe flujo genético entre ellos (Tabla 13).

Tabla 13. Valores de  $N_m$  entre los patrones de restricción.

	Entre grupos	Dentro del grupo R-1	Dentro del grupo R-2
$N_m$	4.682	3.544	1.109

Los valores pueden reflejar como el proceso de domesticación está afectando en términos de migrantes por generación a cada ribotipo. Es notorio que R2 tiene valor de  $N_m$  menor a 3 mientras que R1 y entre grupos tienen altos niveles de flujo génico mayor a 3.

En el análisis de relaciones genéticas (Fig. 4) no se aprecia una división clara que separe los ribotipos, aunque en el clado B se nota una predominancia de cepas del grupo R-1, además de que en este clado se encuentra el ET compartido entre los ribotipos, mientras que el clado D sólo agrupa al grupo R-2 excepto por una cepa.

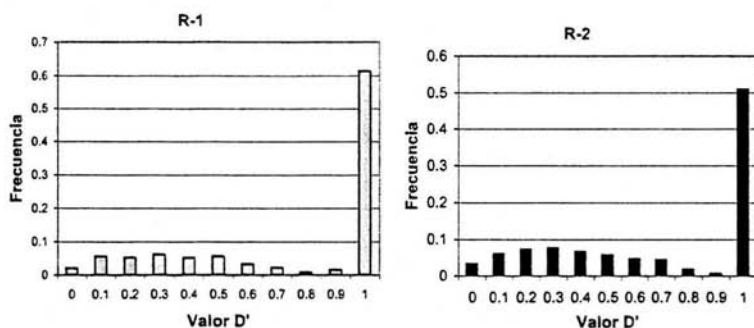


Figura 11. Valores de distribución de  $D'$  por los ribotipos. El Eje X presenta los valores de  $D'$ , mientras en el eje Y se presentan sus frecuencias.

Las distribuciones de  $D'$  de los ribotipos no son estadísticamente diferentes entre ellas ni al compararlas con la muestra total ( $p > 0.05$ ), lo que sugiere que la recombinación puede estar ocurriendo en la misma magnitud dentro y entre los ribotipos.

El análisis de los valores de  $V_O/V_E$  para los ribotipos mostró un valor para el grupo R-1 de 2.005 en los aislados y de 1.822 para los ETs, mientras que el grupo R-2 tuvo valores de 2.372 y 2.151 respectivamente, todos los valores resultaron significativamente diferentes de 1. El ribotipo R-2 tiene un valor mayor de desequilibrio debido que el clado D está conformado únicamente por cepas de este ribotipo (exceptuando una), pero además también tiene cepas distribuidas en los demás clados, lo cual refleja una diversidad de bacterias que probablemente no tienen oportunidad de intercambio genético (esto puede sugerir diferentes hábitos de nodulación), lo cual a su vez eleva el nivel de desequilibrio en R-2. Por su parte, el grupo R-1 prácticamente sólo se mantiene en los clados A y B, debido a esto sus niveles de desequilibrio son menores que los presentados por el grupo R-1.

## 5.7 Análisis de secuencias.

Se obtuvieron 8 secuencias parciales del gen 16S ribosomal con el fin de corroborar la existencia de los ribotipos (R-1 y R-2) obtenidos en base a los patrones de restricción que presentó la muestra. Se obtuvieron un total de 8 secuencias parciales (de 560 pares de bases), cuatro para cada ribotipo. Las secuencias fueron comparadas con Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), en donde los mayores niveles de similitud se encontraron con secuencias del género *Rhizobium*. Las secuencias que presentaron mayor nivel de similitud se incluyeron en el análisis, así como secuencias de especies del mismo género que se encuentran alejadas, para obtener el grupo externo se incluyeron las especies *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti* (Fig. 12).

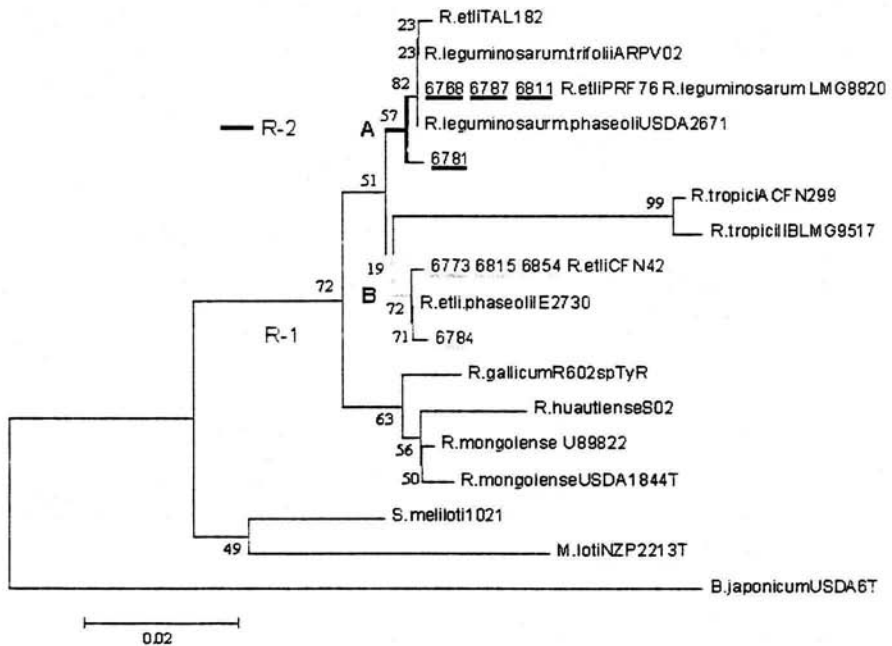


Figura 12. Dendrograma de las secuencias del gen 16S ribosomal de ambos patrones de restricción así como de cepas de referencia obtenidas del Gen Bank, generado por medio del método de Neighbor-Joining con el modelo de Tamura-Nei, en los nodos se muestran los valores de Bootstrap.

En la figura anterior se observa la separación de las secuencias en dos grupos principales clado A y B, dentro de los cuales se agrupan exclusivamente cepas de cada uno de los patrones de restricción. En el clado A se agrupan los aislados que pertenecen al grupo R-2 mientras que en el clado B los aislados del grupo R-1, el valor de Bootstrap apoya la formación de estos clados. Es notorio que las cepas del grupo R-1 (Clado B) se agrupan únicamente con cepas de la especie *R. etli*, mientras que las cepas del grupo R-2 (Clado A) se agrupan con secuencias de distintas biovariedades de la especie *R. Leguminosarum*, aunque también en este clado se incluyen secuencias de cepas de *R. etli*. Como grupo hermano al clado B se agrupan las dos cepas de *R. tropici*, sin embargo el valor de Bootstrap resulta muy bajo como para separarlo del clado B. En un clado exterior se observan las especies *R. gallicum*, *R. mongolense* y *R. huautlense*, y

por último se encuentra el grupo externo, teniendo a *B. japonicum* como la especie más lejana. La distribución de las especies no es consistente con lo reportado, ya que se ha propuesto que *R. gallicum* y *R. mongolense* son especies más cercanas a *R. etli* que *R. tropici* (Sawada et al., 2003).

Tomando los resultados obtenidos por los patrones de restricción así como por el análisis de las secuencias, se podría afirmar la existencia de los ribotipos, como grupos genéticos, sin embargo hay que considerar que este análisis fue llevado a cabo con dos técnicas moleculares diferentes, pero del mismo marcador, el gen 16S ribosomal. Debido a lo anterior, podría resultar arriesgado afirmar o negar la existencia de los ribotipos entidades genéticas, sin embargo, los análisis de los resultados de la técnica de MLEE pueden ayudar a esclarecer con mayor objetividad lo obtenido con el gen 16S.



## 6 Discusión.

### 6.1 El uso de los patrones de restricción del gen 16S ribosomal para la identificación de especies y grupos genéticos.

En el presente trabajo se hizo patente la importancia de tener un método eficaz que permita la identificación de especies, sobre todo cuando se trabaja con bacterias, ya que en muchos casos la delimitación de una especie puede resultar un problema serio. Los análisis de los patrones de restricción sugieren que las cepas analizadas en este trabajo pertenecen a la especie, *Rhizobium etli*, esto va de acuerdo con lo antes reportado, ya que *P. vulgaris* nodula con al menos 5 especies de *Rhizobium* (Eardly et al., 1995, Aguilar et al., 1998, Silva et al., 2003; Martínez Romero, 2003), sin embargo, *R. etli* es la especie que nodula predominantemente con el frijol común en México (Eardly et al., 1995, Silva et al., 2003). Sin embargo, se identificó un polimorfismo en una de las enzimas de restricción, lo cual en principio puede sugerir la existencia de dos grupos genéticamente diferentes, este punto se discutirá más adelante.

### 6.2 Diversidad y diferenciación genética.

La diversidad de ETs ( $H_x$ ) es 0.987, la cual resulta bastante alta (Tabla 2), este valor es un reflejo de la proporción de ETs por cepa. Los valores altos de  $H_x$  pueden ser producto de eventos como migración y recombinación (Harrison et al., 1989; Valera, 1997), lo cual sugiere que la población analizada puede encontrarse bajo estos eventos dinámicos. No se detectó la existencia de algún genotipo dominante, esto puede deberse a un sesgo producido por el tamaño de muestra o bien, a que todos los ambientes en donde fueron muestreadas las plantas son muy heterogéneos, lo que propicia la existencia de una diversidad de microambientes con una diversidad de genotipos localmente adaptados, por lo que las plantas tienen acceso a una amplia poza de genotipos (Souza et al., 1994;

Hagen y Hamrick, 1996). Los dos ETs compartidos entre los aislados de los diferentes tipos de plantas pueden ser de cepas que resultan competentes sin importar la domesticación de las plantas, sin embargo, se necesitaría de un análisis más extenso para comprobar que su presencia se debe a su competitividad o por migración.

La diversidad genética ( $H_E$ ) de la muestra total es de 0.489, que resulta menor al valor obtenido en las plantas silvestres (0.511). Al considerar los valores de  $H_E$  para los aislados de los distintos tipos de plantas se observa una tendencia a disminuir  $H_E$  en las plantas que presentan mayores características de domesticación de 0.511 en la silvestres a 0.397 en las domesticadas (Tabla 3 y Fig. 3). Lo anterior no corresponde con lo antes propuesto, ya que en estudios realizados en Puebla y Morelos, cuanto mayor es el grado de domesticación mayor es nivel de diversidad genética de las bacterias que nodulan a la planta (Souza et al., 1994; 1997), en estos sitios se observó una fuerte dominancia de algunos genotipos tanto en plantas silvestres como en plantas criollas, mientras que las plantas cultivadas presentaron una estructura más equitativa de genotipos de rizobios. Esto se atribuye a que la planta presenta adaptaciones que le permiten seleccionar algunos genotipos de rizobios, sin embargo, conforme aumenta el grado de tecnificación de cultivo la capacidad para seleccionar genotipos disminuye. Lo anterior ha sido observado sobre todo al comparar cepas de plantas silvestres con cepas de plantas cultivadas (Souza et al., 1994; 1997). En el presente trabajo se observa una estructura equitativa en todos los tipos de planta, cual nos indica en principio, que no hay una selección genotipo específica por parte de la planta.

La diferenciación genética entre los aislados de tres tipos de planta resultó baja aunque significativa, sin embargo, al realizar el análisis pareado de los tipos de planta se encontró un valor más alto de  $G_{ST}$  entre los aislados silvestres y domesticados (Tabla 4), lo cual indica que el proceso de domesticación de las plantas está afectando la estructura genética de la población de *R. etli* simbióticas

en esta localidad. Por su parte la diferenciación entre los aislados weedy y los silvestres fue significativa, lo cual sugiere que la estructuración de la población no está influenciada en gran medida por la separación geográfica sino por la domesticación de las plantas.

Considerando ahora el nivel de planta, se observa un comportamiento similar al de los tipos de planta, tanto la diversidad genética promedio ( $H_S$ ) como la diversidad total ( $H_T$ ) bajan en los aislados de plantas weedy y domesticadas (Tabla 5). La diferencia más grande se observa en la diversidad genética total, teniendo el valor de  $H_T$  más alto en el nivel silvestre (0.504) y el más bajo en el nivel domesticado (0.387). Los niveles de diferenciación genética se encuentran dentro de los niveles reportados para isoenzimas (Silva et al., 1999), aunque cabe señalar que los valores más altos se dan para plantas de monocultivo (i.e.  $G_{ST} = 0.19$ , Valera, 1997). Los resultados de diferenciación genética podrían sugerir que las plantas domesticadas están nodulando con genotipos bacterianos muy similares, lo cual puede indicar que estas plantas presentan poca variación entre ellas. Ahora bien, en las plantas silvestres se observa una mayor estructuración, esto sugiere que estas plantas tienen a su disposición una poza genética de bacterias mayor o se asocian con linajes bacterianos distintos. A pesar de todo lo anterior, ninguno de los valores de diferenciación entre plantas resultó significativo, lo cual puede deberse, como ya se mencionó, al tamaño de la muestra y al número de aislados por planta, aunque los resultados bien pueden mostrar alguna tendencia.

### **6.3 Flujo genético.**

El valor de  $Nm$  entre los aislados de los tres tipos de planta es bajo (2.82), aunque entre silvestre y domesticado se obtuvo el valor más bajo ( $Nm = 1.39$ ) mientras que entre silvestre y weedy el valor fue de 1.74. Wright, (1951) postula que se necesita de un flujo genético de  $Nm > 4$  para evitar que las poblaciones diverjan y se mantengan como una unidad evolutiva, mientras que un valor

cercano a 1 indicaría que las poblaciones se encuentran diferenciadas genéticamente y que el flujo genético es demasiado reducido y permite que las poblaciones diverjan. Lo anterior sugiere la posibilidad de que los aislados de plantas silvestres y domesticadas mantengan niveles de flujo genético reducidos, lo cual podría permitir que puedan divergir como unidades diferentes en un futuro.

En el caso del nivel de las plantas, no fue posible obtener los valores de  $Nm$  debido a que la diferenciación genética no resultó significativa en ningún caso (Tabla 6), lo cual sugiere que el flujo genético es alto. En este punto hay que señalar un hecho importante: este estimado del flujo genético se obtiene a partir del índice de diferenciación genética  $G_{ST}$ , el cual mide la cantidad proporcional de variación dentro de subpoblaciones (en este caso entre plantas) con respecto a la variación total, sin especificar la identidad de los alelos (Hedrick, 2000), esto aunado al número reducido de aislados por planta puede ocasionar un subestimado de la diferenciación genética. Lo anterior únicamente pretende señalar las limitaciones que pudiera presentar el análisis. A pesar de lo anterior, el estimado de migrantes por generación sigue resultando útil, ya que si bien en este caso no indica el número exacto de genotipos migrantes, sí ofrece un muy buen estimado del flujo genético, y el resultado obtenido puede sugerir que la recombinación entre los aislados de las plantas aumenta en gran magnitud debido a la domesticación. Este resultado sugiere que el ambiente que representa el suelo de cultivo propicia el movimiento del suelo (lo que beneficia la migración), lo que puede resultar en un ambiente más homogéneo, esto evita la creación de muchos microambientes en los que se da lugar a adaptaciones muy específicas (lo cual además limita la diversidad genética) permitiendo poca diferenciación.

#### **6.4 Relaciones genéticas.**

En el dendrograma de la figura 4 se muestra que en general las cepas de plantas silvestres son las que forman un grupo definido (clado D), pero además se observa que se encuentran prácticamente dispersas en todo el dendrograma, lo

cual refleja el alto nivel de diversidad de genotipos de rizobios que se asocian con plantas silvestres, esto habla de la existencia de un acervo de rizobios que se asocian únicamente con estas plantas, aunque también puede sugerir que se están asociando selectivamente a un cierto linaje genético de rizobios. En el caso de las cepas de plantas domesticadas se observa que llegan a formar pequeños grupos, aunque ninguno de estos resulta exclusivo de estas cepas a distancias genéticas menores a 0.1, no así el caso de los aislados de plantas weedy, que no forman grupos apreciables.

Otro hecho importante que muestra el análisis de relaciones genéticas es que la presencia de los clados puede estar sugiriendo la existencia de linajes evolutivos, ya que el clado D se muestra particularmente lejano de los otros tres clados, esto es congruente con los valores de diferenciación  $G_{ST}$  y número de migrantes  $Nm$ , los cuales indican que los aislados silvestres se encuentran más diferenciados de los demás tipos de planta. Por su parte, las relaciones genéticas entre los aislados de los diferentes tipos de plantas son congruentes con todo anteriormente obtenido, ya que se muestra al grupo de las cepas de plantas silvestres más alejado (Fig. 5).

## 6.5 Desequilibrio de ligamiento.

La frecuencia de los valores de la distribución de  $D'$  (Fig. 6 y 11) muestra que tanto los ribotipos como el total de la muestra presentan desequilibrio de ligamiento, es decir, mantienen básicamente una estructura clonal. Cabe señalar que los ribotipos no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Los niveles de  $V_O/V_E$  en los tipos de planta (Tabla 6) muestran que las poblaciones se encuentran en desequilibrio de ligamiento, aunque es mayor en los aislados silvestres. Cabe mencionar que en todos los análisis de desequilibrio de ligamiento se observó que el valor de  $V_O/V_E$  fue menor cuando sólo se tomaron en cuenta los ETs, sin embargo, como el número de ETs compartidos es reducido,

dichos valores cambian poco y mantienen su proporción unos con respecto a otros cuando se usan todas las cepas, todo esto indica que no existe una estructura epidémica. En el análisis pareado de los aislados de los tipos de planta se observa que en todos los casos existe desequilibrio de ligamiento (Tabla 7), aunque, cabe señalar que los aislados de plantas weedy y domesticadas tuvieron el nivel más bajo, aunque significativo, de  $V_O/V_E$ . lo que sugiere poca recombinación entre los aislados de estos tipos de planta, lo cual se contrapone con lo obtenido con  $G_{ST}$ , ya que dichos aislados no presentaron diferenciación significativa, lo cual daría una valor infinito de  $Nm$ . Lo anterior podría sugerir eventos de migración entre las cepas de plantas weedy y domesticadas pero con poca recombinación. Sin embargo, esto no sería coherente con la distancia geográfica de las plantas, por lo que las similitudes entre las cepas de cada tipo de planta no se debe a eventos de flujo genético y recombinación.

En el análisis de las cepas del dendrograma, es de notar que los clados B y C tienen valores no significativos de  $V_O/V_E$ , lo cual sugiere niveles considerables de recombinación, aún cuando estos clados se componen de aislados pertenecientes a los tres tipos de plantas. Por su parte, el clado D muestra el nivel más alto de desequilibrio de ligamiento (lo que sugiere menor recombinación), además de que éste clado se compone de cepas únicamente silvestres, es el que se encuentra más alejado genéticamente. El análisis pareado entre los clados (Tabla 9) refleja la lejanía del clado D, sobre todo con los clados B y C, ya que sus valores de  $V_O/V_E$  son considerablemente altos (3.017 y 3.051, respectivamente). En un estudio en donde se encontraron especies de rizobios en los cuales se presenta una barrera para la recombinación los niveles de  $V_O/V_E$  resultaron de 3.90 (Silva et al., 2003). Si bien lo anterior no necesariamente indica que las cepas de los clados B y C presentan una barrera reproductiva con el clado D, sí indica que tienen niveles de recombinación nulos ó muy bajos. Esto es interesante, ya que dentro de los clados B y C existen cepas de plantas silvestres, lo que sugiere que estas cepas mantienen nula o muy poca recombinación con las cepas de plantas silvestres del clado D. Al comparar lo anterior con los niveles de

desequilibrio de ligamiento dentro de los clados A, B y C se observa que puede existir más recombinación aún cuando agrupan a cepas de todos los tipos de plantas. Todo lo anterior confirma que las cepas del clado D conforman un linaje distinto dentro de la muestra.

## 6.6 Recapitulando los datos.

En principio, los aislados de los tres tipos de plantas muestran valores de  $H_E$  diferentes. El hecho de que la diversidad genética sea más baja en los aislados de plantas domesticadas en principio indica que el comportamiento de la diversidad genética no necesariamente está ligado al tamaño de la muestra, ya que se cuenta con un número menor de aislados weedy que domesticados, y sin embargo estos últimos son los que presentaron la  $H_E$  más baja (Tabla 3 y Figura 3). La disminución de la diversidad genética se observó tanto en los aislados de los distintos tipos de plantas como a nivel de planta. Por otra parte, al tomar en cuenta los datos de diferenciación genética se observa que los aislados weedy y los domesticados están más relacionados, lo cual está apoyado por el análisis de relaciones genéticas así como por el análisis de desequilibrio de ligamiento, esto nos lleva otra incógnita: ¿realmente éste fenómeno sucede por eventos de migración y recombinación entre las cepas de estos tipos de plantas? Resulta improbable que la única causa sea la recombinación, ya que la cercanía geográfica entre los aislados weedy y silvestres supondría que ambos tendrían la misma posibilidad de tener eventos de recombinación con las cepas domesticadas, tampoco sería muy plausible que existiera una barrera reproductiva entre los aislados silvestres y domesticados, ya que el análisis de relaciones genéticas muestra algunas cepas silvestres cercanas a las domesticadas. Tomando en cuenta todo lo anterior, una respuesta podría ser la siguiente: El ambiente silvestre puede resultar más heterogéneo, lo que propicia mayor diversidad de genotipos bacterianos, lo que puede aumentar la poza génica de donde las plantas silvestres pueden asociarse con rizobios, no así con los ambientes de los aislados weedy y domesticados, en donde las condiciones

pueden propiciar la recombinación local, además se ha observado que ciertos factores (pH, Ca, temperatura, la fertilización química, etc.) en el ambiente pueden provocar una disminución en la variación genética de las bacterias asociadas, lo cual puede seleccionar a ciertos genotipos de rizobios y precisamente que la divergencia observada de las cepas silvestres se deba a que éstas no son competentes en los ambientes de los aislados weedy y domesticados (asumiendo claro, que las cepas silvestres se encontrasen en todos los ambientes de los distintos tipos de plantas). Otra posibilidad sería que el proceso de domesticación de las plantas esté ocasionando que las plantas silvestres y domesticadas se asocien con rizobios muy diferentes; Papa y Gepts (2003) proponen la existencia de un flujo genético asimétrico entre las plantas domesticadas y silvestres, teniendo mayor flujo genético de las plantas domesticadas hacia las silvestres, por lo que las plantas híbridas resultantes (en este caso las plantas weedy) pueden tener ciertas características que resulten muy parecidas a las plantas de cultivo. Debido a lo anterior, las plantas weedy y domesticadas pueden estar seleccionando genotipos de bacterias similares, mientras que las silvestres genotipos distintos, en este caso se asumiría que se puede encontrar la misma poza génica bacteriana en todos los ambientes de los tipos de plantas. Sin embargo, la respuesta más plausible parece ser una combinación de las dos anteriores: existe un acervo de bacterias que son seleccionadas sólo por las plantas silvestres, pero también las condiciones en los ambientes de las plantas weedy y domesticadas provocan una disminución de la poza genética disponible de rizobios. Con lo anterior se explicaría la disminución en la diversidad genética en los aislados domesticados además de la divergencia en las cepas silvestres.

Considerando aparte la explicación anterior, el grupo de cepas silvestres resulta particularmente interesante, por lo cual se realizó un análisis adicional de relaciones genéticas usando únicamente a estas cepas (Fig. 10).



En la siguiente figura se observa que todos los aislados silvestres (exceptuando uno) conservan su clado con respecto al dendrograma de todas la cepas y además la distancia genética que separa a los clados A, B y C del D es prácticamente la misma, esto, aunado a los resultados obtenidos de desequilibrio de ligamiento entre los clados (Tabla, 13) habla de la posibilidad de tener distintos linajes dentro de las cepas silvestres. Debido a que las cepas del clado D son muy divergentes y a su vez están relacionadas, cabe la posibilidad de que se hayan originado de un genotipo ancestral, el cual fue exitoso y que posteriormente divergió.

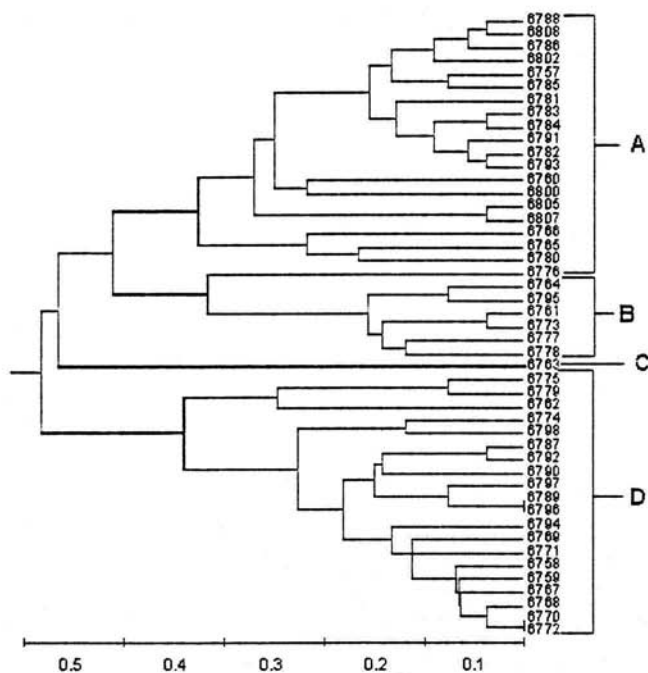


Figura 10. Dendrograma de las relaciones genéticas de los aislados silvestres, generado con el método de UPGMA. Se señala el clado al que pertenecen en el dendrograma de la Figura 4.

## 6.7 Análisis de secuencias del gen 16S ribosomal.

En el dendrograma de las secuencias se forman dos clados en los que se que separa a los ribotipos junto con distintas especies de *Rhizobium*, sin embargo, también se observa que distintas cepas de la especie *R. etli* se encuentran en ambos clados, de hecho, dentro del clado A se relaciona con *R leguminosarum*. Lo anterior puede sugerir que las secuencias del gen 16S, o al menos la región utilizada, puede no ser suficiente para distinguir entre especies cercanas.

Ahora bien, el análisis del gen 16S ribosomal tanto de los patrones de restricción como las secuencias, parecen apoyar la existencia de dos grupos dentro de la misma especie. En este punto resulta necesario cuestionar la validez del uso de un sólo marcador para distinguir especies y grupos genéticos. Cabe señalar que el gen 16S ha sido ampliamente utilizado como marcador para clasificar especies, incluyendo a los rizobios, Gaunt et al. (2001) realizan un análisis en el cual se muestra una relación consistente del gen 16S con los genes *atpD* y *recA*, con lo que se corrobora su robustez como marcador. Sin embargo, se han tenido evidencias de transferencia horizontal del gen 16S, aunque esto se detecta por la presencia de múltiples copias de este gen en el genoma. Cilia et al. (1996) mencionan que la subunidad 16S puede no ser adecuada para análisis filogenéticos entre especies cercanas (ya no hablar de linajes dentro de una misma especie) debido a que existe la posibilidad de que no existan suficientes diferencias entre las secuencias. Sin duda una de las polémicas en el uso de este gen es la cantidad necesaria de variación que debe presentarse para poder separar en grupos a las bacterias. Han sido reconocidas las ventajas que tiene el gen 16S como marcador para la clasificación de especies, sin embargo puede resultar arriesgado basarse únicamente en un sólo marcador ya sea para la clasificación de especies o para el reconocimiento de linajes evolutivos o grupos genéticos. Debido a lo anterior se ha propuesto que las clasificaciones deben ser basadas en un enfoque polifásico, el cual no debe limitarse a la evidencia de un gen, sino también debe tomar en cuenta datos ecológicos y bioquímicos, entre otros. Por su parte, los análisis de MLEE no muestran evidencia alguna de la

existencia de especies distintas, por lo que se tiene mayor evidencia de que *R. etli* es la especie encontrada en los nódulos de las plantas muestreadas en las localidades de estudio en el presente trabajo.

## 6.8 Grupos genéticos y ribotipos.

Numéricamente, los aislados pertenecientes a cada ribotipo no resultaron estadísticamente diferentes. A nivel de planta tampoco se encontraron diferencias significativas en lo que al número de ribotipos se refiere, esto quiere decir que al menos en esta muestra, las plantas no presentan una predominancia de algún ribotipo en sus nódulos en ninguno de los tipos de plantas.

Si se toman en cuenta los ribotipos, se aprecian valores similares de  $H_x$  (Tabla 10), aunque si se observa dentro de cada ribotipo a cada uno de los tipos de planta, aparentemente hay diferencias entre ellos, sin embargo su comportamiento puede deberse al tamaño de muestra para cada grupo genético para cada tipo de planta.

La figura 10 muestra de que manera la diversidad genética de los ribotipos se comporta de manera distinta. El descenso de la diversidad genética del linaje R-1 es evidente, por lo que la baja en la diversidad genética ( $H_E$ ) del grupo R-1 puede ser la causa de la disminución de  $H_E$  cuando se considera a la muestra total. Sin embargo, lo anterior no responde la pregunta acerca de la razón por la que se presenta mayor diversidad en aislados de plantas silvestres que en domesticadas, más bien se tendría que reformular la pregunta refiriéndose a la causa de dicho comportamiento diferente de los ribotipos. Resultados obtenidos por Souza et al. (1997), muestran que la competencia de genotipos dentro de condiciones ecológicas específicas puede causar la diferencia en la abundancia entre dos localidades (en este caso serían los tipos de plantas), lo cual puede sugerir que la diferencia en los datos encontrados para cada grupo genético se debe a una presión selectiva en el ambiente de las plantas domesticadas (la cual

puede ser ajena a la selección genotipo-específica por parte de las plantas) y está beneficiando al grupo genético R-2 y castigando al grupo genético R-1, lo que se refleja en el comportamiento de su diversidad genética.

El nivel de flujo genético entre los ribotipos es considerablemente alto,  $N_m = 4.682$ , si se considera lo postulado por Wright, los ribotipos pueden tener suficiente flujo genético para evitar que diverjan como unidades evolutivas independientes. En el presente estudio, la migración tiene un papel homogeneizador entre las poblaciones, es por esto que la especiación alopátrica es el modelo más común, ya que el flujo genético es cortado por las barreras geográficas. También es posible que el proceso de domesticación sea relativamente reciente desde el punto de vista evolutivo y que los posibles procesos de divergencia se encuentren en una etapa temprana.

En el análisis de relaciones genéticas de la figura 4, no se observa una división clara, sin embargo en los clados C y D predominan cepas del grupo R-2 (entre estos dos clados se agrupan el 82% de las cepas de este ribotipo), mientras que en los otros clados se pueden observar pequeños grupos de cada uno de los ribotipos, aunque no se definen claramente. Lo anterior corrobora los resultados de  $N_m$ , ya que las cepas de ambos grupos genéticos pueden estar manteniendo flujo genético y recombinación suficiente como para que se mantengan relacionados genéticamente.

Dentro de los ribotipos se muestra también desequilibrio de ligamiento, aunque mayor para el grupo R-2, lo cual resulta del hecho de que parte de sus cepas se encuentran dentro del clado D y el resto repartidas entre los demás clados. El valor de desequilibrio de ligamiento para toda la muestra corrobora que ambos ribotipos son la misma especie si se toma en cuenta lo antes mencionado acerca del valor de  $V_o/V_E$  para especies diferentes de rizobios que comparten hospederos (Silva et al., 2003).

La existencia de los ribotipos puede tener una gran repercusión sobre los resultados obtenidos en el presente estudio, sin embargo se encontraron evidencias que sugieren o que rechazan la existencia de los ribotipos. He aquí un resumen:

Datos que apoyan la existencia de los ribotipos como grupos genéticos:

- a) La evidencia de los patrones de restricción del gen 16S.
- b) Congruencia del análisis de secuencias del gen 16S que sustenta la división de la muestra por los ribotipos.
- c) Comportamiento distinto de los ribotipos de su diversidad genética ( $H_E$ ) en los distintos tipos de planta, así como en distintos niveles (planta, tipo de planta, total).
- d) Distintos valores de  $G_{ST}$  para cada uno.
- e) Los ribotipos se distribuyen en pequeños clados, así como la clara predominancia del grupo R-2 en los clados C y D.

Datos que no apoyan la existencia de los ribotipos:

- a) El uso de un sólo marcador para definir a los ribotipos.
- b) La presencia de un ET compartido entre los grupos.
- c) Los valores de diversidad obtenidos a nivel de planta pueden estar influenciados por el número de cepas analizadas.
- d) Mayor estructuración debida a la domesticación de las plantas que a la división de los linajes (a nivel de muestra total).
- e) Los valores de  $N_m$  así como los de desequilibrio de ligamiento sugieren eventos de recombinación entre los ribotipos.
- f) Si bien se forman grupos, no hay una separación absoluta de los ribotipos en los análisis de relaciones genéticas.

Las diferencias observadas sugieren que los ribotipos pueden tener una tendencia hacia la especialización ecológica teniendo eventos de selección que la mantiene, sin embargo, los niveles de recombinación no permiten su separación como unidades evolutivas. De aceptar la premisa anterior se podría sugerir la existencia de linajes evolutivos que podrían divergir a pesar de los niveles de recombinación. La incógnita que pudiera residir sobre la validez de los métodos utilizados para definir a los ribotipos podría verse aclarada usando otros marcadores moleculares, además sería conveniente realizar un muestreo en escala temporal para confirmar que los ribotipos se están separando en realidad. También se debería llevar a cabo un muestreo de las bacterias del suelo, ya que los rizobios del suelo son más diversos genotípicamente que los que nodulan, esto es resultado de un complejo proceso de selección de algunos genotipos por parte de la planta y por el efecto de procesos estocásticos relativos al efecto fundador por parte de las poblaciones de bacterias cercanas a la raíz (Hagen y Hamrick, 1996) en donde el resultado final del proceso de simbiosis es el reclutamiento de una fracción de las poblaciones simbióticas del suelo. Teniendo el muestreo del suelo permitiría saber si las diferencias en la variación genética se deben a diferencias numéricas en la rizósfera, o bien si se debe a diferencias en la competitividad para nodular plantas de cultivo. Para lo anterior también sería conveniente realizar experimentos de inoculación en jardín común probando las diferentes plantas.

Ribotipos y clados divergentes, ¿podrían separarse por completo?

En el presente trabajo se observó la influencia tan fuerte que está teniendo el proceso de domesticación de las plantas de *P. vulgaris* sobre la población de *R. etli* en la zona de estudio, se observaron niveles de desequilibrio de ligamiento considerablemente altos entre los aislados silvestres y domesticados, lo cual sugiere bajos niveles de recombinación, y por otra parte se tiene a dos posibles ribotipos que están teniendo altos niveles de recombinación.

Maynard Smith et al. (1993) proponen que las estructuras clonales (altos niveles de desequilibrio de ligamiento) pueden deberse a aislamiento geográfico o ecológico (o que no existe un sistema de intercambio genético). Sin embargo, para el caso de las plantas silvestre y weedy sería difícil la existencia de aislamiento geográfico y ya no hablar de los ribotipos. Esto indica que la posibilidad de separación ya sea de las cepas de las plantas silvestres y weedy o de los ribotipos se podría dar por un aislamiento ecológico.

Tanto la migración como la recombinación son fuerzas evolutivas importantes para mantener la cohesividad de las especies, en este caso la recombinación esta manteniendo a los grupo genéticos unidos como especie ya que los valores de desequilibrio de ligamiento indican que está ocurriendo cierto nivel de recombinación. Se ha observado que los rizobios no son naturalmente competentes para la transformación, por lo que el intercambio genético ocurre por conjugación o por transducción (Hynes y Finan, 1998).

Cohan (2002) argumenta que el intercambio genético entre las bacterias no puede evitar la divergencia, dada su rareza y promiscuidad, y plantea que el aislamiento sexual es irrelevante para la evolución de divergencia del mundo bacteriano. Bajo esta visión las especies asexuales están sujetas a su propia fuerza de cohesión, la selección natural que purga diversidad genética dentro de las poblaciones. 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; 2002).

## 7 Conclusiones.

- a) Es indispensable contar con algún método que permita distinguir las posibles subdivisiones genéticas que presente una muestra, ya sean ribotipos o especies.
- b) La especie de rizobio asociada a *P. vulgaris* en las localidades de estudio es *R. etli* lo que es consistente con la predominancia de esta especie como simbiote del frijol común.
- c) Los distintos análisis del gen 16S ribosomal sugieren la existencia de ribotipos, lo cuales presentan diferencias en su diversidad y estructura genética, aunque presentan altos niveles de recombinación.
- d) La domesticación de *P. vulgaris* está influenciando sobre los genotipos de rizobios con los cuales se asocia.
- e) La diferenciación genética de las bacterias asociadas a las plantas está ligada al proceso de domesticación y no a la distancia geográfica.
- f) Las plantas silvestres presentan selectividad por bacterias simbióticas divergentes de las asociadas con las plantas domesticadas y weedy.
- g) Sería conveniente utilizar distintos marcadores moleculares para comprobar la identidad de los ribotipos, así como para corroborar los datos obtenidos con las isoenzimas.
- h) Se necesita ampliar la muestra en número para tener datos más robustos de diversidad y diferenciación genética (sobre todo a nivel de planta) y además tener aislados del suelo, así como un análisis en escala temporal para observar el comportamiento de los ribotipos.



## 8 Anexo.

### Medios de Cultivo y Buffer utilizados.

#### PY Solido.

5.0 g peptona de caseína  
3.0 g extracto de levadura  
10 ml  $\text{CaCl}_2$  0.7M  
15.0 g agar  
1.0 Lt. agua destilada

#### PY Líquido

5.0 g peptona de caseína  
3.0 g extracto de levadura  
10 ml  $\text{CaCl}_2$  0.7M  
1.0 Lt. agua

#### Agar

4g Agar grado bacteriológico  
250ml Agua

Calentar hasta disolver completamente, mantenerlo tapado a 60° C entre cada uso.

#### UL

10 g peptona de caseína  
150 ml glicerol  
850 ml agua destilada

#### Buffer T G (Tris-glicina)

30 g Trizma base  
144g Glicina  
Aforar en 10 litros de agua destilada  
Ajustar el pH a 8.5

#### Buffer 0.09M Tris HCl pH = 7.0

44.4g Trizma base  
350ml 1M HCl  
Aforar en 4 litros de agua  
Ajustar el pH lo necesario

#### Buffer 0.09M Tris HCl pH = 8.0

44.4g Trizma base  
248ml 1M HCl  
Aforar en 4 litros de agua  
Ajustar el pH lo necesario

#### Buffer 0.20M Tris HCl pH= 9.0

98.6 g Trizma base  
120 ml 1M HCl  
Aforar en 4 litros de agua  
Ajustar el pH lo necesario

#### Buffer TAE 10x

48.4 g Trizma base  
11.42 ml Ácido acético glacial  
20 ml EDTA 0.5 M pH= 8

Ajustar pH 8.2 - 8.3

### Protocolo de extracción de ADN.

#### Tratamiento Previo.

- Cultivar las bacterias en PY sólido durante 48 hrs, en estría simple (una raya).
- En un tubo de 1.5 ml estéril agregar 0.5 ml de sulfato de magnesio al 10 mM.
- Tomar una asada pequeña de bacterias (calculando una cantidad de 2 colonias medianas) y diluirlas en la solución. Homogeneizar perfectamente. Centrifugar a 14,000 RPM y eliminar el sobrenadante.
- Repetir el paso anterior 2 veces.
- Mantener los tubos siempre en hielo. En el último enjuague, dejar los tubos en el hielo durante 30 min antes de centrifugar.
- Eliminar totalmente el sobrenadante colocando los tubos boca abajo en un papel secante.

#### Lisis Celular

- Agregar 300 de solución de lisis y resuspender las células pipeteando suavemente varias veces.
- Incubar a 80° C por 5 min. Es conveniente mezclar invirtiendo los tubos suavemente 5-10 veces.
- Inmediatamente después someter las muestras a -80° C por 5 min.
- Agitar con el vortex vigorosamente durante 10 seg.

#### Tratamiento con RNAsa.

- Agregar 4 µl de solución de RNAsa.
- Mezclar invirtiendo los tubos 20-30 veces.
- Incubar a 37° C durante 15-30 min.
- Mantener las muestras en hielo.

#### Precipitación de proteínas.

- Agregar 100 µl de solución de precipitación.
- Agitar con el vortex vigorosamente durante 20 seg.
- Centrifugar a 14,000 RPM por 3 min. Se formará un pequeño botón en el fondo del tubo.
- Tomar 300 µl del sobrenadante (¡cuidando siempre de no tocar el botón blanco!) y transferirlos a un tubo nuevo.
- Mantener las muestras en hielo.

### Precipitación de ADN.

- Agregar 300 µl de isopropanol al 100% y frío (a 20° C).
- Mezclar invirtiendo los tubos 50 veces. Dejar reposar durante la noche a -20° C.
- Centrifugar a 10,000 RPM durante 1-2 min. Se formará un pequeño botón en el fondo.
- Eliminar el sobrenadante y escurrir los tubos en papel secante hasta eliminar todo el isopropanol.
- Agregar 300 µl de etanol al 70% frío (a -20° C). Invertir el tubo varias veces (¡No perder de vista el botón!). Centrifugar a 14,000 RPM y eliminar el sobrenadante.
- Repetir el paso anterior 2-3 veces. ¡Al eliminar el sobrenadante se debe de cuidar de no perder el botón!
- Eliminar el exceso de alcohol en papel secante en la campana de flujo laminar hasta que el botón esté perfectamente seco. Para facilitar el secado es conveniente incubar el botón a 65° C durante un min y después en la campana de flujo laminar.

### Hidratación del ADN

- Agregar 300 µl de agua ultra pura.
- Incubar a 65° C durante 30-60 min (es conveniente mezclar las muestras durante la incubación), hasta que el ADN esté perfectamente diluido.

### Protocolo de amplificación del gen 16s ribosomal.

Reactivo	Concentración	Cantidad por tubo	Concentración final
Buffer	10x	5µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	30mM	5.8µl	3.5mM
DNTP's	10mM	1.5µl	0.3mM
Primer fD <sub>1</sub>	10mM	0.75µl	0.15mM
Primer rD <sub>1</sub>	10mM	0.75µl	0.15mM
Taq	5U/µl	0.2µl	1U/µl
H <sub>2</sub> O	----	34µl	----
ADN	10-20ng/µl	2µl	0.2-0.4 ng/µl
	<b>Volumen total</b>	<b>50 µl</b>	

Programa del termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo	
1	94° C	3 min.	} 33 ciclos
2	94° C	1 min.	
3	59° C	1 min.	
4	72° C	1 min.	
5	72° C	5 min.	
6	4° C	∞	

Las secuencias de los primers (Weisburg et al.,1991) son las siguientes:

fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

rD1 (5'-AAGCTTAAGG-AGGTCATCCAGCC-3').

**Protocolos para la restricción enzimática del producto de la amplificación del gen 16s ribosomal.**

*MspI* 5'-C^C G G-3'  
3'-G G C^C-5'

Reactivo	Concentración	Cant. por tubo	Concentración final
Producto PCR	10-20 ng/μl	13 μl	0.5-1 ng/μl
Buffer*	10x	2 μl	1x
Enzima	20 U/μl	0.25 μl	5 U
H <sub>2</sub> O	--	4.75 μl	--

*PstI* 5'-C T G C A^G-3'  
3'-G^A C G T C-5'

Reactivo	Concentración	Cant. por tubo	Concentración final
Producto PCR	10-20 ng/μl	13 μl	0.5-1 ng/μl
Buffer*	10x	2 μl	1x
Enzima	20 U/μl	0.25 μl	5 U
H <sub>2</sub> O	--	4.75 μl	--

*Sau3A*I 5'-<sup>^</sup>G A T C -3'  
3'- C T A G<sup>^</sup>-5'

Reactivo	Concentración	Cant. por tubo	Concentración final
Producto PCR	10-20 ng/μl	13 μl	0.5-1 ng/μl
Buffer*	10x	2 μl	1x
Enzima	10 U/μl	0.5 μl	5 U
H <sub>2</sub> O	--	4.5 μl	--

\*Usar el buffer correspondiente según la enzima.

Las restricciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando las muestras a 37° C durante 60 min. Una vez obtenidas, las restricciones de los productos se corrieron en geles de agarosa al 2% a 100 volts durante 3 horas en buffer TAE 1x. Posteriormente, los geles se tñieron con bromuro de etidio (1mg/ml), las bandas se registraron usando un transiluminador UV y fotos Polaroid.

### Isoenzimas.

Sustratos empleados en la tinción de enzimas.

#### Isocitrato deshidrogenasa (IDH)

1.0 ml Tris HCl<sub>2</sub> pH= 7.0  
1.5 ml NADP  
15 gotas dl-ácido isocítrico  
8 gotas de MgCl<sub>2</sub>  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS\*\*  
2ml agar

#### Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH)

0.6 ml Tris HCl pH= 8.0  
1.5 ml NADP  
12 gotas D-Glucosa-6-fosfato.  
6 gotas MgCl<sub>2</sub>  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS\*\*  
2 ml agar

#### Malato Deshidrogenasa (MDH)

1.0 ml Tris HCl pH= 8.0  
1.5 ml NAD  
20 gotas de sustrato málico^^  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
2 ml agar

#### Malato Deshidrogenasa NADP (ME)

0.6 ml Tris HCl pH= 8.0  
1.5 ml NADP  
20 gotas de sustrato málico^^  
2 gotas de MgCl<sub>2</sub>  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS  
2 ml agar

#### ^^Sustrato Málico

180 ml agua  
20 ml Tris HCl pH= 9.0  
3.68 g L-ácido málico  
Ajustar a pH= 8.0

Fosfoglucomutasa (PGM)

1.0 ml Tris HCl pH8.0  
1.5 ml NADP  
5 gotas  $MgCl_2$   
5 gotas solución Glucosa-1-fosfato\*\*  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS\*\*  
2 ml agar

Xantina Deshidrogenasa (XDH)

1.0 ml Tris HCl pH=8  
1.5 ml NAD  
20 gotas Hipoxantina  
5 gotas MTT  
5 gotas PMS\*\*  
2 ml agar

\*\*Solución Glucosa-1-fosfato

250 mg Glucosa-1-fosfato Grade III  
250 mg Glucosa-1-fosfato Grade VI  
5.0 ml agua

Peptidasa (PEP)

2.0 ml 0.02M  $Na_2HPO_4$  (ajustado pH= 7.5)  
4 gotas peroxidasa  
8 gotas o-Dianisidina (diHCl salt)  
2 gotas  $MgCl_2$   
8 gotas péptido (L-Phenylalanyl-L-leucina 10mg/ml)  
4 gotas L-amino ácido oxidasa\*\*  
2 ml agar

\*\*Sustancia lábil o fotosensible, agregar inmediatamente antes de usar.

**Protocolo para la obtención de lisados.**

- En matraces de 125 ml en los cuales se adicionará 25 ml de medio PY líquido y se inocularán con una asada de la cepa previamente crecida en medio PY sólido. Se incubará por 48 horas.
- En un tubo para centrifuga de 50 ml verter el contenido de los cultivos, centrifugar a 5,000 RPM (es importante usar una centrifuga refrigerada y mantener las muestras en hielo) por 2 min, tirar el sobrenadante.
- Agregar 150  $\mu$ l de solución de  $MgCl_2$  10 mM, agitar con el vortex hasta disolver la pastilla completamente, centrifugar 5 min a 7,500 RPM y desechar el sobrenadante. Repetir este paso 2 veces más.
- Transportar la pastilla disuelta a un tubo de 1.5 ml, agitar hasta homogeneizar.
- Congelar las muestras durante 48 hrs.

- Centrifugar las muestras hasta que se descongelen a 7,500 RPM. Tirar el sobrenadante.
- Adicionar 50 µl de lisozima (8 mg/ µl) y 150 µl de buffer Tris HCl pH= 8. Agitar con el vortex hasta homogeneizar.
- Congelar a - 20° C por 5 min y posteriormente descongelar a temperatura ambiente. Al ser descongeladas las muestras, su temperatura no debe sobrepasar los 5° C. Repetir ésta operación 2 veces más.
- Después de la última descongelada, centrifugar a 10,000 RPM durante 1 min. El sobrenadante debe ser transparente, de lo contrario, agregar más lisozima y buffer y repetir el paso anterior.
- Transportar el sobrenadante (lisado) en alícuotas de 50 µl y conservar a - 20° C hasta el momento de ser utilizados.
- Es indispensable mantener siempre los lisados fríos.

Los lisados obtenidos se corrieron en láminas de acetato de celulosa a 180 volts durante 14 minutos utilizando el sistema de buffer TG, posteriormente fueron teñidas con los sustratos antes mencionados.

**Tabla de datos de las cepas usadas en este estudio.**

Patrones de restricción

Isoenzimas

# CEPA	MspI	PstI	Sau3AI	IDH	PEP	G6PDH			XDH		MDH			ME			
6757	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	9	3	2
6758	A	B	A	4	4	2	1	3	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6759	A	A	A	5	4	2	1	4	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6760	A	A	A	3	4	3	3	4	2	9	2	4	2	2	2	9	1
6761	A	B	A	4	5	4	3	6	2	1	2	3	2	2	2	2	2
6762	A	A	A	4	9	2	2	5	3	9	2	3	9	2	9	9	9
6763	A	A	A	4	4	4	2	6	3	2	2	4	1	2	2	3	1
6764	A	B	A	3	5	4	3	7	1	2	2	3	2	2	2	2	2
6765	A	A	A	4	4	3	1	4	2	1	2	4	2	2	1	3	2
6766	A	B	A	4	3	4	2	3	2	2	2	4	2	2	1	3	2
6767	A	A	A	4	4	3	1	4	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6768	A	A	A	4	4	2	1	4	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6769	A	A	A	4	4	2	1	4	2	1	2	3	2	2	1	9	1
6770	A	A	A	4	4	2	2	4	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6771	A	A	A	4	4	2	1	4	2	1	2	3	9	2	4	9	9
6772	A	A	A	4	4	2	2	4	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6773	A	B	A	4	5	4	3	7	2	1	2	3	2	2	2	2	2
6774	A	A	A	4	4	2	2	4	3	1	2	3	3	2	4	9	3
6775	A	A	A	4	4	2	1	4	2	9	2	9	9	2	3	9	9
6776	A	B	A	3	5	3	3	6	1	1	2	4	2	2	1	3	1
6777	A	B	A	3	5	3	3	6	1	1	2	3	2	2	2	2	2
6778	A	B	A	3	5	4	3	7	1	1	2	4	2	2	2	2	2
6779	A	A	A	4	4	2	1	4	9	9	2	9	9	2	9	9	9

6780	A	B	A	3	4	3	2	4	2	2	2	4	2	3	1	3	2
6781	A	A	A	5	4	3	3	5	1	1	2	4	2	2	3	3	1
6782	A	A	A	5	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	3	3	1
6783	A	B	A	5	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	3	9	9
6784	A	B	A	5	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	3	9	2
6785	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	2	9	2
6786		B	A	5	4	3	3	5	3	2	2	4	2	2	4	3	2
6787	A	A	A	4	4	2	1	4	2	1	2	3	2	3	9	3	3
6788	A	B	A	5	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	4	3	2
6789	A	A	A	5	4	2	1	4	2	1	2	3	2	2	9	3	2
6790	A	A	A	4	4	2	1	4	2	1	2	3	2	9	9	9	9
6791	A	B	A	5	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	3	2	1
6792	A	A	A	4	4	2	1	3	2	1	2	3	2	3	9	3	3
6793	A	B	A	5	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	4	3	1
6794	A	A	A	5	4	2	2	4	2	1	2	3	2	2	5	9	2
6795	A	B	A	5	5	4	3	7	1	2	2	3	2	2	9	2	2
6796	A	A	A	5	4	2	1	4	2	1	2	3	2	2	9	3	2
6797	A	A	A	4	4	2	1	4	2	1	2	3	9	2	9	3	2
6798	A	A	A	4	4	2	2	4	2	1	2	3	3	2	2	3	3
6800	A	B	A	5	4	3	3	2	2	9	2	4	2	2	9	2	3
6802	A	B	A	4	4	3	3	5	3	2	2	4	1	2	4	3	2
6805	A	B	A	5	5	3	3	2	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6807	A	B	A	5	4	3	3	2	2	1	2	3	2	2	4	9	2
6808	A	A	A	4	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	4	3	2
6809	A	A	A	3	4	3	2	6	3	1	2	4	1	2	2	3	1
6810	A	B	A	3	5	3	3	6	1	2	2	4	2	2	2	3	2
6811	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	9	3	2
6812	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	3	3	2
6813	A	A	A	3	4	3	1	6	3	2	2	4	1	2	1	3	2
6814	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	3	2	2	3	2
6815	A	B	A	3	5	3	3	5	1	2	2	4	2	2	9	9	2
6816	A	B	A	3	5	4	3	7	1	1	2	3	2	2	1	2	2
6817	A	A	A	3	5	3	1	6	3	2	2	4	1	2	2	3	1
6818	A	B	A	3	4	3	2	6	3	2	2	4	1	2	2	3	1
6819	A	A	A	3	4	3	3	5	2	1	2	3	2	2	1	2	1
6820	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6821	A	B	A	3	5	3	3	5	1	1	2	3	2	2	2	3	2
6822	A	B	A	4	4	3	2	2	2	1	2	4	2	2	1	3	2
6823	A	A	A	3	4	2	3	5	1	1	2	4	1	2	2	3	1
6824	A	B	A	5	4	3	3	6	1	2	2	4	2	2	4	3	2
6825	A	B	A	4	5	4	3	6	2	1	2	3	2	2	2	2	2
6826	A	A	A	3	5	3	3	5	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6827	A	B	A	3	5	4	3	6	1	2	2	4	2	2	2	2	2
6828	A	A	A	3	5	4	3	5	1	2	2	4	2	2	1	2	2
6829	A	A	A	3	4	3	3	6	2	2	2	4	2	2	9	3	2
6830	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6832	A	A	A	3	5	4	3	7	1	2	2	4	2	2	9	3	2
6833	A	A	A	3	4	4	1	5	3	2	2	4	1	1	2	3	2
6834	A	A	A	3	5	4	3	6	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6835	A	A	A	3	5	5	3	6	1	2	2	4	2	2	2	3	2
6836	A	B	A	4	5	3	3	6	1	2	2	4	2	2	2	3	2



6837	A	A	A	4	5	3	3	5	2	1	2	3	2	2	2	3	2
6838	A	B	A	4	5	4	3	6	2	2	2	3	2	2	2	2	2
6840	A	A	A	4	5	4	3	7	2	1	2	3	2	2	1	2	2
6841	A	A	A	4	5	4	3	6	2	1	2	3	2	2	2	2	2
6842	A	A	A	3	9	3	2	6	1	1	2	4	2	2	2	9	2
6843	A	A	A	3	5	4	3	6	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6844	A	A	A	3	5	4	3	5	1	1	2	4	2	2	2	2	1
6845	A	A	A	3	5	3	2	6	3	2	2	4	2	2	2	2	2
6846	A	A	A	4	4	3	2	2	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6847	A	A	A	4	5	4	3	5	1	2	2	3	2	3	2	2	2
6848	A	B	A	3	9	3	9	9	1	2	2	4	2	2	2	2	2
6849	A	B	A	3	5	4	3	5	1	1	2	3	2	2	2	2	2
6850	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	9	3	2
6851	A	A	A	3	4	4	2	6	3	2	2	4	1	2	1	9	9
6852	A	B	A	3	4	3	3	5	2	2	2	3	2	2	2	3	2
6853	A	B	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	2	2	2
6854	A	A	A	4	5	4	3	5	1	1	2	3	2	2	2	2	2
6855	A	A	A	3	5	3	3	5	2	2	2	4	2	2	2	3	2
6856	A	A	A	3	4	3	3	5	2	2	2	4	2	2	1	3	2
6857	A	B	A	3	5	4	3	6	1	2	2	3	2	2	2	2	2
6858	A	B	A	3	5	4	3	6	1	2	2	3	2	2	9	2	2
6861	A	A	A	3	4	4	3	6	2	1	2	4	2	2	2	3	2
6862	A	A	A	3	5	4	3	5	2	1	2	3	2	2	2	3	2
6863	B	A	B	4	4	4	2	6	3	2	2	4	1	2	2	3	1
6864	A	B	A	4	5	4	3	6	2	2	2	3	2	2	2	2	2
6865	A	A	A	3	4	3	2	6	3	1	2	4	1	2	9	9	9
6866	A	A	A	4	4	3	3	6	3	3	2	4	2	2	2	3	2
6867	A	B	A	3	5	4	3	5	1	2	2	4	2	2	2	3	2
6868	A	B	A	4	5	4	3	6	2	2	2	3	2	2	2	3	2

## 9 Bibliografía.

- Aguilar O M, Lopez M V y Riccillo P M. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *Journal of Biotechnology*. **91**(2-3):181-8.
- Ahmad, M.H., Rafique Uddin, y McLaughlin, W., 1984. Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 197-203.
- Anyango B, Wilson K J, Beynon J L, y Giller K E. 1995 Diversity of Rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in two Kenyan soils with contrasting pH's. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 4016-4021.
- Baudoin J P, Camarena F y Lobo M. 1997. Improving *Phaseolus* genotypes for multiple cropping cycles. *Euphytica*. **96**:115-123.
- Beebe S, Toro O, González A V, Chacón M I y Debouck D G. 1997. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **44**: 73-91.
- Bernal G y Graham P H. 2001 Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, an comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**: 526-534.
- Bouchet V B. 1997. Estructura genética de *Rhizobium etli*, durante un ciclo de siembra (1994) en Calpan Puebla. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 82p.
- Brock T D, Madigan M T, Martin J M K y Parker J. 1996. Biology of microorganisms. Upper Saddle river, New Jersey : Prentice Hall.
- 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 and Soil* **174**:143-180.
- Bromfield, E S P y Barran L R. 1990. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology*. **36**:369-372.
- Brown A H D, Felman M W y Nevo E. 1980. *Genetics*. **96**: 523-536.
- Burgos P a Castellanos J, Mora Y y Mora J. 1999. Field inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris* ) with high efficiency *Rhizobium* strains. *En Highlights*

- of Nitrogen Fixation Research. Eds. E. Martínez and G Hernández. pp. 225-227. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Caballero-Mellado J y Martínez-Romero E. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*. **26**: 111-121.
- Cilia V, Lafay B y Chisten. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*. **13**(3): 451-461.
- Cohan F M. 1994. Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends in Ecology y Evolution*. **9**:175-180.
- Cohan F M. 2001. Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*. **50**: 513-524.
- Cohan F M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*. **56** : 457-487.
- Cheng T C. 1991. Is parasitism symbiosis? A definition of terms and the evolution of concepts. En *Parasite host associations. Coexistence or conflict?* pp. 15-36 Edited by C A tof, A Aeschlimann and L Bolis. Oxford: Oxford University Press.
- Delgado Salinas A, Bonet A y Gepts P. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. En Gepts (ed.), *Genetic resources of Phaseolus beans*, pp 163-184, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holland.
- Doebley J. 1989. Isozymic evidence and the evolution of crop plants. En *Isozymes in Plant Biology*. D E Soltis and P S Soltis (editors). Pp. 165-191 Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Doyle J J. 1994. Phylogeny of the legume family: An approach to understanding the oringin of nodulation. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*. **25**: 325-49.
- Dykhuizen D E y Green L. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *Journal of Bacteriology*. **173**(22):7257-68.
- 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*). *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(2):507-12.
- Engleman E M. 1979. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Colegio de Posgraduados. Chapingo México 139 pp.

- Escalante A M, Coello G, Eguiarte L E y Piñero D. 1994. Genetic structure and mating systems in wild and cultivated populations of *Phaseolus coccineus* and *P. vulgaris*. (Fabaceae). *American Journal of Botany*. **81**: 1096-1103.
- Ferguson A. 1980. Isozyme studies and their interpretation. En Hawksworth D L, (Ed.) *Prospects in systematics*. The Systematics Association. Special volume Núm. 36.
- Fisher H M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. *Microbiological Reviews*. **3**: 352-386.
- Ford R. 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist*. **156**(6):567-576.
- Freytag G F y Debouck D G. 2002. Taxonomy, Distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *Sida, Botanical Miscellany*, No. 23, December.
- Gaupt M W, Turner S L, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macglip y Young J P W. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 2037-2048.
- Gepts P y Debouck D G. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). En A. van Schoonhoven y O Voysest (eds.), *Common Beans research of crop improvement*, pp 7-53, Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, United Kingdom.
- Gentry H S. 1969. Origin of the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany*. **23**: 55-69.
- Graham P H y Halliday J. 1976. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. En *Exploiting the legume Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Eds. J M Vincent, A S Whitney and J Bose. Pp 313-334. University of Hawaii Miscellaneous Publ. 145.
- 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.
- Harlan J R y Wet J M J de. 1971. Towards a rational classification of cultivated plants. *Taxon* **70**: 509-517.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

- Harrison S P, Jones D G y Young P W. 1989. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. *Journal of General Microbiology*. **135**: 1061-1069.
- Hedrick P W y Thomson G. 1986. A two-locus neutrality test: applications to Humans, *E. coli* and lodgepole pine. *Genetics*. **112**:135-156.
- Hedrick P W. 2000. Genetics of populations. Second edition. Jones and Barlett Publishers, Inc. U S A.
- Hynes F M y Finan T M. 1998. General genetic knowledge. En *The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria*. pp 25-43. Edited by H P Spanik, A Kondorosi, and P J J Hooykas. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Ibarra-Perez F, Ehdai B y Waines G. 1997. Estimation of outcrossing rate in common bean. *Crop Science*. **37**:60-65
- Kaplan, L. y T. F. Lynch (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture. *Economic Botany*. **53**(3): 261-272.
- Laguerre G, Allard M, Revoy F y Amarger N. 1994. Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:56 - 63.
- Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, y N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:56-63.
- Lara M, Cullimore J V, Lea P J, Mifflin B J, Johnston A W B y Lamb J W. 1983. Appearance of novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant* **157**:1-5.
- Lehninger Albert L. 1985. *Bioquímica : Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2ª edición. Barcelona : Omega.
- Lewontin R. C. 1964. The interaction of selection and linkage I. General considerations; Heterotic models. *Genetics*. **49**:49-67.
- Martínez R E, Romero D y Palacios R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Critical reviews in plant sciences*. **1** 59-93.
- Martínez Romero E. 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*. **252**: 11-23.

- Martínez, E., Pardo, M.A., Cevallos, M.A. y Palacios, R. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal Gen. Microbiol.* **131**: 1779-1786.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **41**: 417-426.
- Maynard Smith N, O'Rourke y Spratt B. 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy Science of the U S A.* **90**: 4384-4388.
- McArthur J V y Kovacic D A, Smith M H. 1988. Genetic Diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient *Proceedings of the National Academy Science of the U S A.* **85**: 9621-9624.
- Nei M, Kumar S. 2000. *molecular evolution and phylogenetics.* New York: Oxford University Press.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy Science of the U S A.* **70**:3321-3323.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**:583-590.
- Nei Masatoshi. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press. New York.
- Olivieri I, Frank S A. 1994. The evolution of nodulation in *Rhizobium*: Altruism in the rhizosphere. *The Journal of heredity.* **85**:46-47.
- Pacovsky R S, Bayne H G y Bethlenfalvay G J. 1984. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop. Science.* **24**:101-105.
- Palmer K M y Young J P. 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environmental Microbiology.* **66**(6):2445-50.
- Papa R y Gepts P. 2003. Asymetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics.* **106**: 239-250.
- Peopel M B, Herridge D F y Ladha J K. 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil.* **174**

- Pérez N y Piñero D. 1997. Isoenzimas. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 60: 77-84.
- Piñero D, Martínez E R y Selander R K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. Applied and Environmental Microbiology. 54: 2825-2832.
- Popgene V. 1.32 (32-bit). Population Genetics Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research.
- Rocha M M. 1996. Estructura genética de poblaciones naturales de *Escherichia coli* en mamíferos silvestres. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 75 pp.
- Sadowsky M J y Graham P H. 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. En The Rhizobiaceae pp. 155-172. Edited by H P Spanik, A Kondorosi y P J J Hooykass. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Sadowsky M J y Graham P H. 2002. The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer Verlag.
- SAGAR. 1995. Producción y comercialización de frijol 1987-1993. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México.
- Sawada H, Kuykendall L D y Young J M. 2003 Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. Journal of General y Applied Microbiology. 49: 155-179.
- Segovia L, Piñero D, Palacios y Martínez E. R. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Applied and Environmental Microbiology. 57: 426-433.
- Segovia L, Young J P y Martínez-Romero E. 1993 Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 43(2):374-7.
- Selander R K, Caugant D A, Ochman H, Musser J M y Whittam T S. 1986. Methods of multilocus enzyme lectrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Applied and Environmental Microbiology. 51:873-874.
- Selander R K y Levin B R. 1980. Genetic diversity and structure in *E. coli* populations. Science. 210: 545-547.

- Silva C. 2003. Genética de poblaciones y evolución molecular de *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum*. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 102 pp.
- 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. *Molecular Ecology*. 8: 277-287.
- Silva C, Vinuesa P, Eguiarte L E, Martínez-Romero E y Souza V. 2003. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(2):884-93
- Singh S P, Gepts P y Debouck D G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 45: 379-396.
- Sokal R R y Michener C D. 1985. A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas. *Science Bulletin*. 28:1409-1438.
- Sousa S M y Delgado A. 1979. Herramientas y consideraciones para la revisión del género *Phaseolus*. En Engleman E. M Contribución al conocimiento del frijol (*Phaseolus sp*) en México. Colegio de posgraduados. Chapingo México. pp 139.
- Souza V, Bain J, Silva C, Bouchet V, Valera A, Marquez E y Eguiarte L. 1997 Ethnomicrobiology: Do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar phaseoli?. *Journal of Ethnobiology* 17(2): 249-266.
- Souza V, Eguiarte L E, Avila G, Capello R, Gallardo C, Montoya J y Piñero Daniel. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(4):1260-1268.
- Souza V, Nguyen T T, Hudson R R, Pinero D % Lenski R E. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proceedings of the National Academy Science of the U S A*. 89(17):8389-93.
- Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Ingrid B. Jakobsen, y Masatoshi Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Sullivan T J, Patrick H N, Lowther W L, Scott D B y Ronson C W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy Science of the U S A*. 92: 8985-8989.



- Valera A. 1997. Influencia de las actividades agrícolas sobre la estructura genética de *Rhizobium etli* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*. Tesis profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 91p.
- Vásquez-Arroyo J, Sessitsch A Martínez E y Peña-Cabriales J. 1998 Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains Of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil. **204**:147-154.
- Vilas-Boas G, Sanchis V, Lereclus D, Lemos MV y Bourguet D. 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. **68**(3):1414-24.
- Vlassak K M y Vanderleyden J. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. Critical Review in Plant Sciences. **16** 163-229.
- Wang En Tao, Martínez Romero J, López y Lara I. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En Microbios en Línea. (<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>).
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal ADN amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. **173**: 697-703.
- Wells W C, Isom WH y Waines J G. 1988 Outcrossing rates of six common bean lines. Crop Science **28**: 177-178.
- Whittam, T. S. 1990. ETDIV, ETLINK and ETMEGA programs. Pennsylvania State, U S A
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. **15**: 323-338.
- Young JM, Kuykendall LD, Martínez-Romero E, Kerr A, 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**(Pt 1):89-103.