



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS UNAM
CIUDAD UNIVERSITARIA

FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO
Sinorhizobium

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. EN B. LOURDES TERESA LLORET Y SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ-ROMERO

MÉXICO D.F.

ABRIL

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Esperanza Martínez Romero en el Programa de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

El sustentante agradece el haber contado una beca de postgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro (138514) así como una beca complementaria concedida por la Dirección General del Personal Académico (DGAPA).

Este trabajo se desarrolló con el apoyo financiero otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Posgrado (PAPIIT-DGAPA) (IN 201106), así como también por el GEF PNUMA, TSBF-CIAT y el Instituto de Ecología (INECOL).

Dedicatoria

Con enorme agradecimiento y amor entrañable dedico este trabajo

A mis Padres, Conchita y Luis, dos seres maravillosos que me han amado cada día de mi vida y enseñado el significado de la dedicación. Muchas gracias mamá y papá por el privilegio de ser su hija.

A mí hermano Luis Isidro por sus consejos y apoyo que han sido muy importantes e indispensables en mi vida.

A mí hermana Reme Mary por su cariño y por su apoyo siempre que lo he necesitado.

A Cristy y a mis sobrinos Antonio, Jorge Luis, Pablo Alejandra y Luis.

Agradecimientos

A la Dra. Esperanza Martínez Romero deseo expresarle mi admiración y respeto por su dedicación y entusiasmo por la investigación científica, así como también un profundo agradecimiento por la confianza que depositó en mi, por sus enseñanzas y dirección a lo largo de estos años.

A la Dra. Gloria Soberón le agradezco mucho haberme aconsejado continuar con mis estudios de postgrado.

Agradezco a las Dras. Gloria Soberón Chávez, Carmen Wachter Rodarte, así como al Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann su valiosa participación como miembros de mi Comité Tutorial.

A los miembros del Jurado, las Dras. Carmen Gómez Eichelmann, Lupita Espín Ocampo, Mónica Rosenblueth Laguette, Gloria Soberón Chávez y Carmen Wachter Rodarte, les agradezco mucho sus aportaciones que ayudaron a enriquecer y mejorar esta tesis.

Muchas gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecología Genómica: Ernesto, Julio, Ivonne, Mónica, Toño, Lucía Aline, Martha, Lulú, Lupita, Rocío, Jorge, Martín, Maritza, Christian, Napoleón, Yadira y Janette, que han compartido conmigo la convivencia en el día a día del laboratorio con anécdotas y enseñanzas.

Agradezco enormemente a Ernesto Ormeño su compañerismo y amistad. Aprecio mucho él que me haya brindado su apoyo en momentos decisivos.

A Julio Martínez Romero le agradezco enormemente su apoyo y amistad, y por compartir conmigo sus conocimientos de Bioestadística.

A Ivonne Toledo le agradezco mucho su amistad y su confianza, que han sido importantes para mí.

A Lucy Lulo le agradezco mucho su apoyo indispensable y su amistad.

Al Dr. José Antonio Guerrero y la Mtra. Irma Lozada les agradezco mucho su asesoría y apoyo para el entendimiento de conceptos de inferencia filogenética.

También deseo agradecerle a Marco Antonio Rogel su excelente apoyo técnico en la técnica de MLEE.

Agradezco a Reiner Rincón por haber buscado bacterias simbiotes de árboles de Chiapas de donde pudimos identificar al nuevo linaje de rizobio que se describe en el presente trabajo.

Agradezco a Mary Tavera, Edith Cinta y Shirley Ashworth por su valioso apoyo Bibliotecario.

Agradezco enormemente a la Dra. Dení Rodríguez y Lilia Espinoza por su asesoría, enorme paciencia y apoyo durante estos años de trámites escolares en la Coordinación del Postgrado en Ciencias Biológicas.

Agradezco enormemente a Lolita Rodríguez en la Coordinación del Postgrado en Ciencias Biológicas por su asesoría y eficiencia en la realización de los tramites para la obtención del grado.

Tutor Principal: Dra. Esperanza Martínez Romero

Comité Tutorial: Dra. Gloria Soberón Chávez
Dra. Carmen Wachter Rodarte

Tutor invitado: Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann

Indice

Indice	1
Resumen	3
Abastract	6
I Introducción	8
I.1 Evolución y filogenia de <i>Rhizobium</i>	8
Resumen.....	8
Origen de la diazotrofia.....	8
La fijación de nitrógeno es un proceso antiguo.....	8
Biodiversidad de los diazótrofos.....	9
Coevolución Rhizobio-leguminosa	9
La nodulación ¿carácter ancestral en angiospermas?.....	9
Los factores de nodulación como determinantes del rango de hospedero	10
Origen de los genes <i>nod</i>	11
Ubicación de los genes <i>nod</i>	11
Los genes simbióticos, el paquete genético flexible	11
Expresión de los plásmidos de los rizobios en diferentes fondos genéticos	12
La nodulación en Proteobacteria: ¿es un carácter ancestral?	12
Evolución y filogenia de los linajes de rizobios	13
Tiempo de origen e identidad.....	13
Ubicación de los rizobios dentro de Proteobacteria.....	14
Filogenia de rizobios con base en la comparación de las secuencias del gen <i>rrs</i>	15
Inferencia filogenética a partir de otros genes cromosomales	18
Incongruencia filogenética de los genes simbióticos y del genoma básico	18
Referencias.....	19
I.2 Historia de la taxonomía del género <i>Sinorhizobium</i>	26
I.2.1 Reclasificación del género <i>Sinorhizobium</i>	26
I.2.2 Propuesta del género <i>Sinorhizobium</i>	27
I.2.3 Rechazo y enmienda de la propuesta del género <i>Sinorhizobium</i>	28
I.2.4 Fusión de los géneros <i>Sinorhizobium</i> y <i>Ensifer</i>	30
II Antecedentes y objetivos	32

III Filogenia molecular del género <i>Sinorhizobium</i>	38
III.1 Materiales y métodos	39
1.1 Cepas Bacterianas.....	39
1.2 PCR y secuenciación	41
1.3 Hibridación tipo Southern contra <i>nolR</i>	41
1.4 Hibridación tipo Southern contra <i>rrs</i>	42
1.5 Análisis filogenéticos de las secuencias alineadas	42
1.5.1.1 Saturación de la sustitución de bases en la tercera posición del codón.....	42
1.5.1.2 Selección del mejor modelo evolutivo	43
1.5.1.3 Inferencia filogenética.....	44
1.5.1.4 Análisis de congruencia de las filogenias combinadas	45
1.5.1.5 Intervalos del 95% confianza de la similitud entre- e intra-géneros	46
III.2 Resultados	47
2.1 El gen <i>nolR</i> como marcador para la identificación del género <i>Sinorhizobium</i>	47
2.2 Saturación en las terceras posiciones de los genes <i>gyrA recA</i> y <i>rpoB</i>	49
2.3 Selección del mejor modelo evolutivo para los alineamientos múltiples de los genes <i>gyrA recA</i> y <i>rpoB</i>	49
2.4 Análisis de congruencia de los genes <i>gyrA recA</i> y <i>rpoB</i>	51
2.5 Inferencia filogenética individual y combinada de los genes <i>gyrA recA</i> y <i>rpoB</i>	56
2.6 Intervalos del 95% confianza de la similitud entre- e intra-géneros	90
2.7 Determinación del número de operones ribosomales en <i>Sinorhizobium</i>	92
2.8 Inferencia filogenética del gen simbiótico <i>nodA</i>	95
III.3 Discusión	98
 IV <i>Ensifer mexicanus</i> sp. nov. a new species nodulating <i>Acacia angustissima</i> (Mill.) Kuntze in México	106
 V Conclusiones	125
 VI Referencias I,2, II y IV	127
 Apéndice	
1. <i>Sinorhizobium americanum</i> sp. nov.a new species nodulating native <i>Acacia</i> spp. in Mexico ..	139
2. Números de acceso en el Genbank de las secuencias de los genes cromosomales	150

Resumen

Desde su descripción, el género *Sinorhizobium* ha sido rechazado y enmendado debido a su cercanía con el género *Rhizobium* y de estos dos con *Mesorhizobium*. En la última revisión del género *Rhizobium* se postuló que las especies de *Sinorhizobium* podrían ser consideradas como un subclado de *Rhizobium* bajo el criterio del gen *rrs*. La permanencia del género *Sinorhizobium* como un género diferente de *Rhizobium* demanda un análisis que incluya a un mayor número de cepas de *Sinorhizobium* y que se amplíe el número evidencias que permitan ubicar a las especies de este género como un linaje monofilético independiente de *Rhizobium*.

En este trabajo se construyó la filogenia e intervalos de confianza para la similitud de los alineamientos a partir de la comparación de las secuencias de tres genes cromosomales con funciones conservadas involucrados en la transferencia del flujo de información que son *gyrA*, *recA*, *rpoB*. Los árboles filogenéticos se construyeron en forma individual y combinada bajo tres criterios de inferencia filogenética: máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (MB) con el mejor modelo evolutivo.

En la mayoría de las filogenias construidas, las topologías mostraron tres géneros bien definidos, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* con valores de soporte de bootstraps superiores al 50% para MP y ML, y con probabilidades posteriores cercanas a 1.00 para MB, siendo *Sinorhizobium* y *Rhizobium* los géneros más cercanos. Dentro del género *Sinorhizobium*, la posición de *S. kostiense* y *S. saheli* fue variable y el resto de especies se agrupó en cuatro grupos que si se conservaron. El grupo I fue asignado a las

especies de *S. americanum*, *S. fredii*, y *S. xinjiangense*; el grupo II a *S. medicae*, *S. meliloti* y *S. arboris*; el grupo III a *S. terangaie* y *Ensifer mexicanus* (*Sinorhizobium mexicanum*); y el grupo IV fue asignado a *S. morelense* y *Ensifer adhaerens*.

En los intervalos de confianza, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* mostraron una población compacta y poco variable, distinguible de los demás géneros, y *Rhizobium* fue claramente un grupo muy heterogéneo.

La heterogeneidad dentro de *Rhizobium* permitió distinguirlo de *Sinorhizobium* mediante hibridación tipo Southern utilizando como sonda al gen *nolR* y mediante PCR amplificando a este gen con oligonucleótidos específicos, por lo que se propone que el gen *nolR* podrá ser utilizado como marcador molecular para la detección de *Sinorhizobium* en estudios de biodiversidad.

El número de operones ribosomales (tres) conservado en las especies de *Sinorhizobium* de los grupos I, II y III podría ser considerado como una sinapomorfía que las distingue del grupo IV (cuatro y cinco). Dentro de este grupo, *Ensifer adhaerens* presentó el mayor número de operones (cinco) que corresponden a un tipo de respuesta metabólica que va de acuerdo con su estilo de vida de bacteria depredadora. Esta diferencia sumada a la evidencia filogenética que colocó a este grupo como el más alejado del resto de especies de *Sinorhizobium*, y a los intervalos de confianza de las similitudes que mostraron también que este grupo fue significativamente distinto, cuestiona la validez de la fusión de *Sinorhizobium* y *Ensifer* dentro del mismo género.

Como parte de este estudio se encontró un nuevo linaje de *Sinorhizobium* dentro del grupo III en nódulos de *Acacia angustissima* y fue propuesto para la descripción de una nueva especie dentro del género *Sinorhizobium* que por la fusión con el género *Ensifer* y tener prioridad de nombre, fue descrita como *Ensifer mexicanus*. La filogenia de la simbiosis representada por el gen *nodA* codificado en plásmido fue construida con ML y ubicó al nuevo linaje como pariente de las especies de rizobios americanos aislados de *Acacia*.

Abstract

Since its description, the genus *Sinorhizobium* has been rejected and emended due to its proximity to the genus *Rhizobium*. In the last revision of the *Rhizobium* genus, *Sinorhizobium* was postulated to be a subclade of *Rhizobium* based on the *rrs* gene phylogeny. The permanence of *Sinorhizobium* as an independent genus demands to include more evidences as phylogenies with other genes to probe that *Sinorhizobium* is a monophyletic group.

Identity similarity confidence intervals from the *Sinorhizobium* species and rhizobial representative strains from *Rhizobium* and *Mesorhizobium* were obtained. Individual and combined phylogenetic trees were generated using three phylogenetic inference criteria: maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and bayesian inference (MB) using the best fit model of evolution.

Most of the phylogenetic trees showed three well defined genera, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* and *Mesorhizobium* with bootstraps values greater than 50% for MP and ML, and with posterior probabilities near 1.00 for MB. *Sinorhizobium* and *Rhizobium* were found to be the closest genera. Inside the *Sinorhizobium* genus, the position of de *S. kostiense* and *S. saheli* was variable and the rest of species were clustered in four groups. Group I was assigned to *S. americanum*, *S. fredii*, and *S. xinjiangense*; group II to *S. medicae*, *S. meliloti* and *S. arboris*; group III to *S. terangae* and *Ensifer mexicanus* (*Sinorhizobium mexicanum*); and group IV included *S. morelense* and *Ensifer adhaerens*.

The latter corresponds to the bacteria previously considered to belong to the genus *Ensifer* before its fusion with *Sinorhizobium*.

The confidence intervals of *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* showed low variability and were distinguishable from the other genera. *Rhizobium* was found to be a heterogeneous group. In spite of the heterogeneity found in *Rhizobium*, it was distinguished from *Sinorhizobium* by Southern hybridization using the gene *nolR* and also by its selective amplification by PCR. It is proposed that the *nolR* gene may be used as a molecular marker for the detection of *Sinorhizobium* in biodiversity studies.

The conserved number of ribosomal operons (three) in the rest of the *Sinorhizobium* species could be considered as a synapomorphy that could serve to distinguish it from group IV (four and five). Inside group IV, *Ensifer adhaerens* has a large number of ribosomal operons that may be related to different metabolic responses in accordance to its life style as a bacterial predator. This difference, together with the evidences from the phylogenetic analyses that placed group IV as the most distant respect to the other *Sinorhizobium* groups, and the significant difference in the similarity confidence intervals, questions the validity of the *Sinorhizobium* and *Ensifer* fusion into the same genus.

A new lineage isolated from *Acacia angustissima*, belonging to group III was proposed as a new species. It was named *Ensifer mexicanus* instead of *Sinorhizobium mexicanum* because the fusion of the two genera. This new species was placed close to the other American rhizobia isolated from *Acacia* in a ML phylogeny with *nodA*, which is a plasmid coded gene.

I.2 Historia de la taxonomía del género *Sinorhizobium*

I.2.1 Reclasificación del género *Rhizobium*

En la historia de la taxonomía de los rizobios, el género *Rhizobium* (Frank 1889) definía en un principio a todas las bacterias que inducían la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas y el epíteto específico se basó en la especificidad por su hospedero (Baldwin y Fred 1929; Fred et al 1932). La asignación del nombre de la especie basada en la leguminosa asociada se abandonó debido a la incongruencia reportada dentro de los grupos de inoculación cruzada de leguminosas (Wilson 1944) y a que los genes *nod* que determinan el rango, ganados e intercambiados (Rogel et al. 2001; Martínez-Romero et al. 1987) no son indispensables en la sobrevivencia de la bacteria en vida libre (Soberón-Chávez, 1989, Segovia et al. 1991).

La taxonomía de *Rhizobium* como único género que incluía a las bacterias que se asocian a las leguminosas ha ido cambiando, reclasificándose en distintos géneros (Sawada et al. 2003). La primera reclasificación del género *Rhizobium* fue la separación en dos géneros, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, Jordan 1982 transfirió a los rizobios de lento crecimiento *Rhizobium japonicum* al género *Bradyrhizobium* con la nueva combinación de nombre *Bradyrhizobium japonicum*. Tres especies de *Rhizobium* previamente designadas como *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifolii* y *R. phaseoli* fueron reasignadas a una sola especie, *R. leguminosarum*, y el epíteto específico pasó a definir la biovariedad, *viciae*, *trifolii* y *phaseoli* (Jordan 1984) respectivamente. Las otras dos especies de rápido crecimiento que hasta ese momento habían sido descritas, *R. meliloti* y *R. loti*, permanecieron dentro del género *Rhizobium* y fueron reclasificadas más tarde. Desde 1984 a la fecha, dos

reclasificaciones más han ocurrido dentro del género *Rhizobium*: la propuesta del género *Sinorhizobium* (Chen et al. 1988) para reclasificar a las bacterias de rápido crecimiento que nodulaban al frijol de soya (*R. fredii*), y la reclasificación con la propuesta del género *Mesorhizobium* (Jarvis et al. 1997) para agrupar a las especies de *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* y *R. tianshanense*, cuyas características de crecimiento y homología DNA-DNA mostraban ser intermedias entre las cepas de lento (*Bradyrhizobium*) y de rápido crecimiento (*Rhizobium* y *Sinorhizobium*).

I.2.2 Propuesta del género *Sinorhizobium*

Con la descripción de *R. fredii* (Scholla y Elkan 1984) (actualmente *Sinorhizobium fredii*), se descubre que también existen especies de rizobios de rápido crecimiento que tienen la capacidad de nodular al frijol de soya, que hasta ese momento solamente había sido descritos como *Bradyrhizobium*. La propuesta de *R. fredii* como una especie de *Rhizobium* es cuestionada por Chen et al (1988) en un estudio de taxonomía numérica basado en el análisis de características bioquímicas que analiza más aislados de rápido crecimiento de frijol de soya obtenidas de la región Xinjiang, China. Estos aislados se agrupaban más cercanamente a *R. fredii* que a las demás cepas de *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Bradyrhizobium*, y propone la creación del género *Sinorhizobium* para agrupar *R. fredii* con la nueva combinación *S. fredii* junto con a la nueva especie *S. xinjiangensis* que nodulaban al frijol de soya.

I.2.3 Rechazo y enmienda de la propuesta del género *Sinorhizobium*

Los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* se han mantenido sin cambio desde su propuesta, sin embargo, el género *Sinorhizobium* ha sido rechazado (Jarvis et al. 1992), enmendado (de Lajudie et al. 1994), y fusionado y renombrado (Young et al. 2003).

En la propuesta del género *Sinorhizobium* (Chen et al. 1988) con el análisis de taxonomía numérica utilizando características bioquímicas y no moleculares, *R. meliloti* (*S. meliloti* actualmente) no quedó incluido junto con *S. fredii* y *S. xinjiangense*. Jarvis et al. (1992) rechazan la propuesta del nuevo género *Sinorhizobium*, y solamente admite que *S. fredii* fuera una especie distinta dentro del género *Rhizobium* con base en análisis serológicos (Sadowsky et al 1987), hibridación DNA-DNA comparando especies de *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Wedlock et al 1986), y en la comparación de las secuencias del gen 16S rRNA considerando un fragmento de 260 pb (de la posición 44 a la 337 de *E. coli*) (Jarvis et al 1986). Además, cuestiona el estatus de especie de *S. xijiangense* por tener una secuencia idéntica a la de *S. fredii*.

Posteriormente, de Lajudie et al (1994) realiza un análisis de taxonomía polifásica en el que considera tanto características bioquímicas como moleculares para analizar cepas de aisladas de especies de *Sesbania* y *Acacia* procedentes de Senegal, África occidental (Dreyfus et al. 1981), incluyendo el análisis filogenético utilizando el método de neighbor-joining con secuencias más largas del gen 16S rRNA (1,436 bases). En este análisis filogenético, dos grupos de cepas africanas se agruparon más cerca del clado de *R. meliloti*-*R. fredii* que de las otras especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, por lo que propone la enmienda del género *Sinorhizobium* para agrupar a dos nuevas especies, *Sinorhizobium*

saheli sp. nov. y *S. terangae* sp. nov., junto con *R. meliloti* y *R. fredii* con la nueva combinación de nombre *Sinorhizobium meliloti* y *Sinorhizobium fredii* comb. nov. respectivamente.

Después de la enmienda del género *Sinorhizobium*, seis especies más han sido descritas dentro de este grupo: *S. medicae* nodulando a *Medicago truncatula* (Rome et al. 1996), *S. arboris* aislada de *Prosopis chilensis* (Nick et al. 1999), *S. kostiense* (Nick et al. 1999) de *Acacia senegal*, *S. morelense* de *Leucaena leucocephala* (Wang et al. 2002), *S. americanum* de *Acacia acatlensis*, (Toledo et al. 2003), *S. kummerowiae* de *Kummerowia stipulacea* (Wei et al. 2002) y *Ensifer mexicanus* (*Sinorhizobium mexicanum*) de *Acacia angustissima* (Lloret et al. 2007). Esta última especie fue descrita con el nombre de género *Ensifer* en lugar de *Sinorhizobium* debido a la fusión entre ambos géneros y a la prioridad de nombre de *Ensifer* por haber sido descrito primero (Young 2003).

En la última revisión del género *Rhizobium* (Young et al. 2001) se redefine a la familia Rhizobiaceae para agrupar por el criterio de la comparación del gen 16S rRNA a *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, debido a que *Mesorhizobium* se agrupa más cercanamente a *Phyllobacterium*. Sin embargo, a pesar de que la resolución del 16S rRNA no es suficiente para definir taxa en rhizobia (Vinuesa et al. 2005), se postuló que las especies de *Sinorhizobium* podrían ser consideradas como un subclado de *Rhizobium* (Young et al. 2001). La permanencia del género *Sinorhizobium* como un género diferente de *Rhizobium* demanda un análisis que incluya a todas las especies que hasta ahora han sido asignadas a este género así como otras cepas de *Sinorhizobium* sp. que no han sido afiliadas a las

especies descritas o nuevas especies por describir, y también una muestra representativa de las especies de *Rhizobium*.

I.2.4 Fusión de los géneros *Sinorhizobium* y *Ensifer*

El género *Ensifer* fue propuesto con la descripción de *Ensifer adhaerens*, la única especie de este género (Casida 1982). Esta especie fue descrita como una bacteria depredadora que se adhiere a otras bacterias y las lisa (Casida 1982, Germida y Casida 1983). *E. adhaerens* es capaz de formar nódulos efectivos en *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* cuando le es transferido el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 (Rogel et al. 2001). Debido a esto, y a su proximidad con *Sinorhizobium morelense* en las filogenias construidas con los genes 16S rRNA y *recA*, la fusión de los géneros *Sinorhizobium* y *Ensifer* fue propuesta por Willems et al. (2003).

La fusión de ambos géneros fue aceptada, pero el nombre de *Sinorhizobium* fue rechazado (Young, 2003) debido a que el nombre de *Ensifer* (Casida 1982) tomó prioridad sobre *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) por haber sido descrito primero de acuerdo al Código Bacteriológico (Lapage et al. 1992). El argumento de que *E. adhaerens* podría representar un grupo de rizobio no simbiótico no fue suficiente para conservar el nombre de *Sinorhizobium* sobre el de *Ensifer*. Todas las especies de *Sinorhizoibum* fueron renombradas a *Ensifer* (Young, 2003), de modo que la última especie descrita bajo el nombre de *Sinorhizobium* fue *S. americanum* (Toledo et al 2003) y la última nueva especie descrita tomó el nombre de *Ensifer mexicanus* (Lloret et al. 2007, cap. IV de esta tesis). Sin embargo, en el presente estudio se cuestiona la validez de la fusión de ambos géneros debido a que *Ensifer adhaerens* y su pariente más cercano, *S. morelense*, son las especies

mas alejadas del resto de especies de *Sinorhizobium*. Por esta razón, en el capítulo IV de esta tesis, que corresponde a la publicación de la descripción de la nueva especie *Ensifer mexicanus*, todas las especies que fueron descritas como *Sinorhizobium* aparecen en el texto y figuras con de nombre de *Ensifer* en lugar de *Sinorhizobium*.

II Antecedentes y objetivos.

El éxito de las leguminosas puede ser atribuido a su habilidad para formar nódulos que fijan nitrógeno por la simbiosis con los rizobios. La diversidad de rizobios ha sido reportada en representantes de α - y β -proteobacteria que fueron aislados de plantas leguminosas que representan varias partes del mundo: China (Chen et al. 1988, Wang et al. 2006), Taiwán (Chen et al. 2003), Africa (Ba et al. 2003, de Lujudie 1994, Dreyfus y Dommergues 1981, Haukka et al. 1996, , Nick et al. 1999, Zhang et al. 1991), Sudáfrica (Deschodt et al. 1976), Australia (Eardly et al. 1990, Lafay et al. 2001), Europa (Lindström, 1989, Eardly et al. 1990, Laguerre et al. 2001), Sudamérica (Eardly et al. 1990, Moreira et al. 1998, Velázquez 2001, Ormeño-Orrillo et al. 2006) y México (Wang et al. 1999, Toledo et al. 2003, Wang et al. 2003).

Dentro de la familia Leguminosae, el género *Acacia* como parte de la subfamilia Mimosoideae, es uno de los más amplios, ocupa el segundo lugar con más de 1,350 especies descritas (Maslin et al. 2003). Es un género cosmopolita de árboles que crecen en regiones tropicales y subtropicales con tipo de vegetación de bosque caducifolio. Análisis filogenéticos basados en la comparación del gen *rbcL* que codifica para la enzima RUBISCO dentro del genoma del cloroplasto, sugieren que el género *Acacia* no es monofilético y que deben ser reconocidos cinco subgrupos: *Acacia*, *Aculeiferum*, *Phyllodineae* (que es el más abundante con más de 950 especies naturales de Australia), el “grupo coultieri” y la sección Filicinae (Maslin et al. 2003). Dentro de éste último grupo, se encuentra la especie *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze (*Acaciella angustissima* Britton &

Rose) cuya distribución natural ocurre en el continente americano y se extiende desde el sur de los Estados Unidos de Norte América hasta el norte de Sudamérica (Rico 2007). Las bacterias simbiotes de esta acacia americana no habían sido descritos. En el presente trabajo, se describe una nueva especie dentro del género *Sinorhizobium* con el nombre de *Ensifer mexicanus* (Lloret et al. 2007 en prensa, cap. IV dentro de esta tesis) nodulando a *A. angustissima*. El nombre de género *Ensifer* tomó prioridad sobre *Sinorhizobium* debido a la fusión de ambos géneros (Willems et al. 2003, Young 2003) y por esa razón la nueva especie fue nombrada como *Ensifer* en vez de *Sinorhizobium*. Esta nueva especie fue aislada primeramente de nódulos de *Acacia angustissima* en el parque nacional del Cañón del Sumidero, Chiapas, México como parte del estudio de la diversidad los rizobios de este hospedero (Rincón et. al. no publicado), y posteriormente también de plantas trampa a partir de suelo proveniente de la Sierra de Huautla, Morelos (Lloret et al 2007).

Las especies descritas de *Sinorhizobium* son una parte importante dentro de la diversidad de los rizobios, y la historia de su taxonomía (cap. I.2) plantea la necesidad de un análisis que sostenga y justifique la existencia de este género.

Las comparación de las secuencias moleculares como documentos que han registrado el cambio evolutivo (Zuckerandl y Pauling 1965) permiten establecer relaciones de ancestría-descendencia para construir sistemas de clasificación natural (Woese 1987). Las funciones celulares más conservadas y antiguas son las que están involucradas en los componentes celulares involucrados en el flujo de la información genética: la replicación de DNA, su transcripción a RNA y su traducción a las proteínas, efectoras de la funcionalidad celular (Wose 1987, Brown and Doolitte 1997). El gen *rrs* que codifica para el rRNA 16S,

es sin duda él que más ha sido utilizado en el establecimiento de relaciones filogenéticas y como marcador molecular en la determinación de nuevas especies de procariontes. Sin embargo, el alto grado de conservación entre las especies de rizobios (cap. I.1), y debido también a que existen tres copias de este gen en los genomas de los rizobios de rápido crecimiento que podrían contener secuencias distintas (mosaicismo) por eventos de transferencia horizontal como ya se ha reportado (Eardly et al. 1995, Young y Haukka et al. 1996, Eardly et al. 2005), ha sido propuesto el uso de otros genes con funciones conservadas involucrados en el mantenimiento celular que contribuyan a definir la posición taxonómica de las nuevas especies descritas (Stackebrandt et al. 2002).

Además del gen *rrs*, la filogenia de rhizobia ha sido estudiada con la comparación de las secuencias de los genes con funciones conservadas como son *recA* (Gaunt et al 2001, Vinuesa et al. 2005) que codifica para una proteína involucrada en la recombinación homóloga, *dnaK* (Stepkowski et al. 2003, Eardly et al. 2005) que codifica para una chaperona (proteína reparadora anti-estrés), *rpoB* (Dahllöf et al. 2000, Khamis et al 2003) que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, *atpD* (Ludwing et al. 1993, Gaunt et al. 2001, Vinuesa et al. 2005) que codifica para subunidad β de la ATPasa, y los genes *glnA* (Turner y Young 2000) y *glnII* (Wernegreen y Riley 1999, Vinuesa et al. 2005, Silva et al. 2005) que codifican para dos enzimas con actividad de glutamino sintetasa. El gen *dnaK* de *R. galegae* mostró ser un mosaico que contiene segmentos ajenos (Eardly et al. 2005) y las gráficas de descomposición de ramificación mostraron una señal filogenética conflictiva en las filogenias que contenían al gen *atpD* (Vinuesa et al. 2005). El gen *glnA* está presente en más de una copia en rizobios de rápido crecimiento (genomas de

Sinorhizoibum meliloti 1021 y *Agrobacterium tumefaciens* C58) por lo que al igual que *rrs* también puede presentar segmentos xenólogos. La filogenia con una de las glutamino sintetasas, *glnIII*, es incongruente con la de *glnA* y *rrs*, como lo es el agrupamiento de *Mesorhizobium huakuii* con el clado de *Rhizobium* (Turner y Young 2000). De todos estos genes, tanto en *recA* como *rpoB* que codifican para funciones relacionadas con el flujo de la información genética, recombinación y transcripción respectivamente, no se ha reportado mosaicismo, y además de haber sido utilizados en la filogenia de rhizobia, han sido usados para estudiar las relaciones de otros grupos como *Mycobacterium* (Adékambi y Drancourt. 2004).

El gen *gyrA* que codifica para subunidad α de la girasa, está involucrado en el superenrollamiento del DNA y ha sido útil en el análisis de la diversidad de aislados clínicos de *Klebsiella* (Brisse y Verhoef 2001) y en la definición de una nueva especie dentro de este género, *Klebsiella variicola*, (Rosenblueth et al. 2003) pero aun no ha sido utilizado en la filogenia de rhizobia. El gen *nolR* que codifica para un regulador global (Chen et al. 2005) involucrado en la simbiosis (Cren et al., 1994, Kondorosi et al. 1991), pero codificado en cromosoma a diferencia de la mayoría de genes simbióticos, permite realizar hibridaciones tipo Southern selectivas para distinguir a los géneros de la familia Rhizobiacea del resto de rizobios (Kiss et al. 1998).

De los genes cromosomales arriba descritos, en el presente trabajo se utilizaron *recA*, *rpoB* y *gyrA* que codifican para funciones involucrados con el flujo de información (informativos), y *nolR* que codifica para el regulador global vinculado con simbiosis. Estos

cuatro genes están anotados con una sola copia en el genoma de *S. meliloti* 1021 (Galibert et al. 2001). De estos cuatro genes, tanto *recA* como *rpoB* han sido previamente utilizados en la filogenia de los rizobios, y tanto *gyrA* como *nolR* se utilizan por primera vez en el presente trabajo.

La historia evolutiva de los genes simbióticos codificados en plámidos (Martínez-Romero et al. 1990) o islas simbióticas (Sullivan et al. 1998, Gottfert et al. 2001) depende de su interacción con el ambiente y debe ser interpretada de forma independiente a la de los genes cromosomales. Debido a esto también se construyó la filogenia individual del gen plasmídico *nodA*, que codifica para una enzima acarreadora de grupos acilo que interviene en la acilación de los factores de nodulación, para conocer la posición que ocupan los nuevos aislados de *Acacia angustissima* (Lloret et al. 2007) y los aislados de *Leucaena leucocephala* (Wang et al. 1999) (otra leguminosa de la subfamilia Mimosoideae que comparte simbioses con el género *Acacia*), dentro de la biodiversidad de rizobios que ya ha sido reportada tanto en α - como en β -proteobacteria (Haukka et al. 1998, Moulin et al. 2000, Ba et al. 2003, Chen et al. 2003, Moulin et al. 2004)

Objetivo General

El interés del proyecto está dirigido al estudio de las relaciones de las especies del género *Sinorhizobium* como evidencia de su agrupamiento como grupo monofilético independiente del género *Rhizobium* dentro de la familia Rhizobiaceae mediante el uso de métodos moleculares e inferencia filogenética.

Objetivos particulares

- Secuenciación y comparación de las secuencias de genes cromosomales *nolR*, *gyrA*, *recA* y *rpoB* para el estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Sinorhizobium* y los géneros más cercanos de *rizobios* utilizando distintos criterios de inferencia filogenética.
- Validación del *status* de género de las especies que se agrupan dentro del género *Sinorhizobium* con respecto a sus parientes más cercanos con base en su monofilia.
- Evaluación de la validez de la fusión de las especies de *Sinorhizobium* y *Ensifer* dentro del mismo género.

III Filogenia molecular del género *Sinorhizobium*

En este capítulo se estudian las relaciones de las especies del género *Sinorhizobium* y su posición con respecto a especies representativas de los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium* mediante la comparación de las secuencias de los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB*. Se describen las características de sus secuencias y se estima el mejor modelo evolutivo para la construcción de árboles filogenéticos bajo los criterios de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana. También se establecen intervalos de confianza para comparar las similitudes entre géneros con estos tres genes. Para la determinación de los intervalos de confianza, se consideró a *Ensifer* como género independiente de *Sinorhizobium* como era su posición taxonómica antes de su fusión. También se determinó el número de operones ribosomales dentro de las especies de *Sinorhizobium* y *Ensifer* mediante hibridación tipo Southern contra el gen *rrs* y permitió diferenciar ambos grupos.

En este capítulo se muestra también, la propuesta de utilizar al gen *nolR* como marcador molecular para las especies de *Sinorhizobium* mediante la hibridación tipo southern (Toledo et al. 2007, Apéndice 1 de esta tesis). La inferencia filogenética construida con las secuencias de este gen no se muestra en este capítulo sino en el capítulo IV con la descripción de la nueva especie *Ensifer mexicanus* (Lloret et al. 2007), en donde sólo fueron incluidas las especies de *Sinorhizobium* y dos especies de *Rhizobium* como grupo externo. Esto fue debido a que la menor similitud dentro de *Rhizobium* y *Mesorhizobium*, no permitió el diseño de oligonucleótidos que amplificaran a estos dos géneros. Así mismo, en el cap. IV, el gen *ssb* que codifica para la proteína de pegado a DNA de cadena sencilla, fue utilizado solamente para identificar por producto de PCR positivo a las especies de *Sinorhizobium* pero no en inferencia filogenética.

Los tres genes que codifican para funciones informativas (*gyrA*, *recA* y *rpoB*) fueron más conservados que *nolR* en los tres géneros (*Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*), por lo que en este capítulo, permitieron incluir en los análisis filogenéticos y determinación de intervalos de confianza a especies representativas de los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium*. Además de los genes cromosomales, se construyó la filogenia del gen *nodA* para conocer las relaciones de las especies y cepas de *Sinorhizobium* en la simbiosis.

III.1 Materiales y métodos

III.1.1 Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas se muestran en la tabla III.1.1. Dentro del género *Sinorhizobium* se incluyeron dos cepas más de cada especie a excepción de *S. fredii* y *S. xinjiangense* debido que las cepas *S. fredii* USDA202 y *S. xinjiangense* CCBAU108 (Chen et al 1988) se agruparon con otras especies en los análisis filogenéticos. Tampoco se incluyó a *S. kummerowiae* (Wei et al. 2002). Se incluyeron además, cepas de *Sinorhizobium* sp. aun no asignadas dentro de las especies hasta ahora descritas y que son de interés por rango de hospedero como lo son *Sinorhizobium* sp. NGR234 (Trinick 1980) y *Sinorhizobium* sp. BR816 (van Rhijn et al. 1994). También se incluyeron dos cepas aisladas de *Leucena leucocephala*, (Wang et al 1999), *Sinorhizobium* sp. Lc39 y Lc56, y la cepa *Sinorhizobium* sp. GRX8 para incluir a un aislado de *Phaseolus vulgaris* (Laguerre et al 2001) que no se agrupó con *Rhizobium tropici* ni *R. etli*.

Tabla III.1.1 Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Reference Strains	Plant origen	Geographical origen	Reference/Source
<i>S. adhaerens</i> ATCC 33212 ^T	----	Pensilvania, E.U.A.	Casida (1982)
<i>S. adhaerens</i> ATCC 33499	----	Pensilvania, E.U.A.	Casida (1982)
<i>S. adhaerens</i> CFN EC1002	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colima, México	Torres (2005)
<i>S. americanum</i> CFNEI 156 ^T	<i>Acacia acatensis</i>	Morelos, México	Toledo <i>et al.</i> (2003)
<i>S. americanum</i> CFNEI 54	<i>Acacia cochliacantha</i>	Morelos, México	Toledo <i>et al.</i> (2003)
<i>S. americanum</i> CFNEI 15	<i>Acacia farnesiana</i>	Morelos, México	Toledo <i>et al.</i> (2003)
<i>S. arboris</i> HAMB1 1552 ^T	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudan, Africa	Nick <i>et al.</i> (1999)
<i>S. arboris</i> HAMB1 1396	<i>Prosopis chilensis</i>	Kenya, Africa	Zang <i>et al.</i> 1991
<i>S. arboris</i> HAMB1 1624	<i>Acacia senegal</i>	Kenya, Africa	Zang <i>et al.</i> (1991)
<i>S. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>Glycine soja</i>	Henan, China	Scholla & Elkan (1984)
<i>S. fredii</i> USDA 257	<i>Glycine soja</i>	Henan, China	Scholla & Elkan (1984)
<i>S. kostiense</i> HAMB1 1489 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Sudan, Africa	Nick <i>et al.</i> (1999)
<i>S. kostiense</i> HAMB1 1501	<i>Acacia senegal</i>	Sudan, Africa	Zang <i>et al.</i> (1991)
<i>S. kostiense</i> HAMB1 1679	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudan, Africa	Zang <i>et al.</i> (1991)
<i>S. medicae</i> A321 ^T	<i>Medicago truncatula</i>	Aude, France	Rome <i>et al.</i> (1996)
<i>S. medicae</i> M3	<i>Medicago orbicularis</i>	Syria	Eardly <i>et al.</i> (1990)
<i>S. medicae</i> M102	<i>Medicago truncatula</i>	Syria	Eardly <i>et al.</i> (1990)
<i>S. meliloti</i> USDA 1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>	Virginia, USA	Jordan (1984)
<i>S. meliloti</i> 1021	<i>Medicago sativa</i>		Meade <i>et al.</i> (1982)
<i>S. meliloti</i> CC2013	<i>Medicago sativa</i>	Australia	Eardly <i>et al.</i> (1990)
<i>S. morelense</i> Lc-04 ^T	<i>Leucaena leucocephala</i>	Morelos, México	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>S. morelense</i> Lc-57	<i>Leucaena leucocephala</i>	Morelos, México	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>S. sahelii</i> ORS 609 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. sahelii</i> ORS 600	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. sahelii</i> ORS 611	<i>Sesbania grandiflora</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. sahelii</i> HAMB1496	<i>Acacia senegal</i>	Sudan, Africa	Zang <i>et al.</i> (1991)
<i>S. terangae</i> ORS1009 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. terangae</i> ORS1073	<i>Acacia senegal</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. terangae</i> ORS19	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. terangae</i> ORS604	<i>Sesbania aculeata</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> (1994)
<i>S. xinjiangense</i> CCBAU110 ^T	<i>Glycine max</i>	Xinjiang, China	Chen <i>et al.</i> (1988)
<i>S. xinjiangense</i> CCBAU107	<i>Glycine max</i>	Xinjiang, China	Chen <i>et al.</i> (1988)
BR816	<i>Leucaena leucocephala</i>	Brazil	van Rhijn <i>et al.</i> (1994)
GR-X8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Spain	Laguerre <i>et al.</i> (2001)
Lc56	<i>Leucaena leucocephala</i>	Morelos, México	Wang <i>et al.</i> (1999)
Le16	<i>Leucaena leucocephala</i>	Morelos, México	Wang <i>et al.</i> (1999)
Le39	<i>Leucaena leucocephala</i>	Morelos, México	Wang <i>et al.</i> (1999)
NGR234	<i>Lablab purpureus</i>	Papua, New Guinea	Trinick 1980
ITTG-R4	<i>A. angustissima</i>	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México	Lloret <i>et al.</i> in press
ITTG-R7	<i>A. angustissima</i>	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México	Lloret <i>et al.</i> in press
CFN-SH1	<i>A. angustissima</i>	Huautla Mountains, Morelos, México	Lloret <i>et al.</i> in press
CFN-SH3	<i>A. angustissima</i>	Huautla Mountains, Morelos, México	Lloret <i>et al.</i> in press
CFN-SH4	<i>A. angustissima</i>	Huautla Mountains, Morelos, México	Lloret <i>et al.</i> in press
ITTG-S4	<i>A. angustissima</i>	Sumidero Canyon, Chiapas, México	Lloret <i>et al.</i> in press
ITTG-S64	<i>A. angustissima</i>	Sumidero Canyon, Chiapas, México	Lloret <i>et al.</i> in press
ITTG-S68	<i>A. angustissima</i>	Sumidero Canyon, Chiapas, México	Rincón (unpublished)
ITTG-S70	<i>A. angustissima</i>	Sumidero Canyon, Chiapas, México	Rincón (unpublished)
ITTG-S71	<i>A. angustissima</i>	Sumidero Canyon, Chiapas, México	Rincón (unpublished)
ITTG-R11	<i>A. angustissima</i>	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México	Rincón (unpublished)
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i> ,	Guanajuato, México	Segovia <i>et al.</i> 1993
<i>R. galegae</i> HAMB1 540	<i>Galega orientalis</i>	Finlandia	Lindström <i>et al.</i> 1989
<i>R. gallicum</i> R602sp ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Maine et Loire, Francia	Amarger <i>et al.</i> 1997
<i>R. huautlense</i> LMG 18254 ^T	<i>Sesbania herbacea</i>	Morelos, México	Wang <i>et al.</i> 1998
<i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T	<i>Indigofera</i> spp.	Meseta de Loess, noroeste de China	Wei <i>et al.</i> 2002
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>		Jordan 1982
<i>R. tropici</i> CFN299	<i>Phaseolus vulgaris</i>		Martínez-Romero <i>et al.</i> 1991
<i>A. tumefaciens</i> C58	-----		Wood <i>et al.</i> 2001
<i>A. rhizogenes</i> chag4	-----		
<i>A. rhizogenes</i> kag3	-----		
<i>M. huakuii</i> MAFF303099			Kaneko <i>et al.</i> 2000
<i>M. loti</i> USDA 3471 ^T	<i>Lotus tenuis</i>	Nueva Zelanda	Jarvis <i>et al.</i> 1982
<i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	España	Nour <i>et al.</i> 1995
<i>M. plurifarium</i> ORS1032 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal, África	de Lajudie <i>et al.</i> 1998
<i>Brucella melitensis</i> 16M			DelVecchio <i>et al.</i> 2002
<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG 3331 ^T			Holmes <i>et al.</i> 1988

Ceparios de procedencia de las cepas utilizadas en el presente estudio:

Las cepas bacterianas procedieron de los siguientes ceparios: CCBAU, Culture Collection of Beijing Agricultural University, Beijing, China; CFN, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrogeno (ahora Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, Morelos); HAMB1, Culture Collection of the Department of Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland; ORS, Culture Collection of the Laboratory of Soil Microbiology, ORSTOM, Dakar, Senegal; USDA, Beltsville *Rhizobium* Culture Collection, Beltsville Agricultural Research Center, United States Department of Agriculture, Beltsville, Md., U.S.A.

III.1.2 PCR y secuenciación

El DNA genómico fue obtenido utilizando el Kit Tissue and Culture (Amershm Pharmacia) y las amplificaciones se realizaron con la *Taq* polimerasa provista por Invitrogen. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el sistema de ROCHE para ser secuenciados. Los tres *loci* cromosomales con funciones informativas, *gyrA*, *recA* y *rpoB*, y el gen plasmídico *nodA* fueron amplificados y secuenciados. Los oligos y condiciones para su amplificación así como el tamaño y posiciones de la región amplificada son las reportadas en la tabla S2, cap. IV.

III.1.3 Hibridación tipo Southern contra *nolR*

A partir del alineamiento de las secuencias del gen *nolR* de *S. meliloti* cepa AK631 (X59050) y de *R. leguminosarum* bv. *viciae* TOM (AJ001934) se diseñaron los oligos SmmolR730F (5' GGY ATC GAT TCG KCA CC 3') y SmmolR1142R (5'GGT GCT GAG AAA GAG CCG ATT 3') para sintetizar un fragmento de *nolR* de 413 pb que comprenden la mitad 5' del gen (199 pb) y una región corriente arriba de 214 pb. En la región corriente arriba de *S. meliloti* incluye parte de otro ORF designado YO4457 en el genoma de *S. meliloti* 1021. El diseño de estos oligos se muestra en la fig. III.2.1A. Se utilizaron 25 ng del producto de PCR de *S. meliloti* 1021 como sonda marcada con ³²P utilizando Rediprime Amersham en hibridación tipo Southern contra DNA total restringido con la enzima *EcoRI*. La ausencia de sitios internos *EcoRI* dentro del gen *nolR* de *S. meliloti* 1021 fue comprobada mediante el uso del programa BIOEDIT v.5 (Hall 1999). *Ochrobactrum anthropi*, *Brucella mellitensis* y *R. etli* fueron incluidos en la misma membrana para conocer la sensibilidad del método para detectar a *Sinorhizobium*. Con el

mismo par de oligos también se sintetizó un producto de PCR del gen *nolR* de *R. leguminosarum* USDA2370 como sonda contra la misma membrana para obtener una hibridación cruzada.

III.1.3 Hibridación tipo Southern contra *rrs*

El gen *rrs* que codifica para el rRNA 16S forma parte del operón ribosomal (*rrn*) que también contiene al resto de genes que codifican para el rRNA. El número de operones ribosomales se determinó a partir de hibridación tipo southern utilizando como sonda un producto de PCR de 1477 pb obtenido con los oligos fD1 y rD1 (Weisburg et al. 1991). El PCR fue eluído de gel de agarosa al 0.85% y 25 ng fueron marcados con ^{32}P para ser utilizado como sonda contra DNA total de las especies de *Sinorhizobium* restringido con la enzima *HindIII* que no presentó sitios de corte al interior de *rrs*. La ausencia de sitios de corte interno para enzimas de restricción se determinó a partir del alineamiento de las secuencias del gen *rrs* utilizando el programa BIOEDIT (Hall, 1999).

III.1.5 Análisis filogenéticos de las secuencias alineadas

III.1.5.1 Saturación de la sustitución de bases en la tercera posición del codón.

La saturación de la sustitución en las terceras posiciones del codón obscurece las relaciones filogenéticas debido a que las mutaciones en el tiempo pueden permitir que un estado de carácter ocurra sin que esto signifique divergencia o similitud entre los linajes (Xia & Xie, 2002). La presencia de saturación significativa fue descartada a partir de la prueba de saturación de la sustitución $I_{ss} = H/H_{FSS}$ (Xia et al. 2002) implementada en

DAMBE v4.2.13 (Xia & Xie, 2001). Se compara el valor de I_{ss} .observado con un valor crítico ($I_{ss c}$) que es el valor en donde las secuencias comienzan a perder la capacidad de reconstruir el árbol real. La saturación en la sustitución no es significativa para un valor de $p < 0.001$ si el valor de I_{ss} . observado es menor al valor de $I_{ss c}$.

III.1.5.2 Selección del mejor modelo evolutivo

El mejor modelo evolutivo fue estimado utilizando dos criterios implementados en MODELTEST 3.06 (Posada y Crandall, 2001): 1.- mediante el cociente de ML, de los modelos anidados jerárquicamente (η LTR), $-\lambda=2(\ln L_1 - \ln L_0)$, que se sigue una distribución χ^2 con un número de grados de libertad igual al número de parámetros en los que L_1 y L_0 varían (Huelsenbeck y Ranalla, 1997). Esta prueba selecciona al mejor modelo evolutivo comparando modelos jerárquicamente anidados considerando como hipótesis nula al modelo más simple ($\ln L_0$), y como alternativa al siguiente modelo mas complejo ($\ln L_1$) dentro del orden jerárquico; 2.- mediante el criterio de información Akaike (AIC) (Akaike, 1974), el cual introduce una penalización para modelos con más parámetros. Mientras menor sea el valor de AIC mejor es el modelo. $AIC = -2\ln L + 2n$, en donde L es el valor de máxima verosimilitud de un modelo evolutivo dados los datos, y n es el número de parámetros libres para variar que son en los que difieren ambos modelos (Posada y Crandall, 2001). Las características de las secuencias alineadas y la estimación de los parámetros y de los mejores modelos se encuentran en las tablas IV.2.3.1 y IV.2.3.2.

III.5.1.3 Inferencia filogenética

Se estimó la filogenia de cada uno de los tres genes cromosomales informativos *gyrA*, *recA* y *rpoB* individualmente y concatenando sus secuencias para obtener alineamientos combinados. Las secuencias de cada gen constituyen las particiones de los datos combinados. Con las secuencias de los tres genes se obtuvieron tres parejas de datos combinados: *gyrA+recA*, *gyrA+rpoB* y *recA+rpoB*, y una triple combinación *gyrA+recA+rpoB*. La filogenia de la simbiosis estuvo representada por las secuencias del gen *nodA* codificado en plásmido y no fue concatenada con los genes cromosomales.

Los árboles filogenéticos construidos con las secuencias de los genes cromosomales fueron inferidos bajo los criterios de máxima verosimilitud (ML), máxima parsimonia (MP) e inferencia Bayesiana (MB), y el árbol del gen plasmídico *nodA* fue contruido con MB. El análisis de MP se realizó asignando el mismo peso de caracteres, la estrategia de búsqueda heurística con 1000 adiciones de secuencias al azar y con el método de recambio de bisección y reconexión de ramas (TBR) en PAUP v 4.10b. Cuando el número de árboles más parsimoniosos (MPTs) fue mayor a uno, el árbol consenso del 50% de mayoría fue el seleccionado. Las filogenias con ML fueron generadas con el programa PhyML v 2.4.4 (Guindon & Gascuel 2003) con 6 categorías en la distribución Gama y estimando del parámetro alfa de esta distribución, así como la proporción de sitios invariables, frecuencia de las bases y bajo el modelo más adecuado previamente obtenido en MODELTEST bajo el criterio AIC. La robustez de las topologías de ML y MP fue estimada a partir de la prueba no paramétrica de Bootstrap (Felsenstein, 1985) generando 100 y 1000 pseudoreplicas al azar respectivamente. La estimación filogenética mediante inferencia Bayesiana se realizó mediante el programa Mr. Bayes v 3.0 (Ronquist and

Huelsensbeck, 2003). La estimación de los parámetros bajo el modelo evolutivo más adecuado y las probabilidades *a priori* fueron las asignadas por el programa. Las cadenas de Markov Metropolis Montecarlo (MCMC) implementadas en el programa Mr. Bayes v 3.0 fueron utilizadas para estimar la distribución de las probabilidades posteriores utilizando tres cadenas calientes y una fría con un millón de generaciones muestreando un árbol de cada 200. Se verificó la convergencia de dos análisis independientes graficando los valores de verosimilitud en función del número de generaciones y obteniendo su análisis de regresión. A partir de esta gráfica se verificó que el número de árboles que el programa descarta (25% de burn-in, 1,250 x 2 árboles) fuera suficiente para construir el árbol consenso de 50% de mayoría con 3,751 x 2 árboles de la meseta después del burnin. La robustez de este análisis estuvo sustentada en las probabilidades posteriores.

Para los datos combinados, sólo las filogenias construidas con Mr. Bayes permitieron utilizar los mejores modelos evolutivos para cada una de las particiones de manera independiente. Para los datos combinados, en la inferencia filogenética con ML se utilizó el modelo de la partición con el modelo más complejo para abarcar a los más sencillos.

III.1.5.4 Análisis de congruencia de las filogenias combinadas

La congruencia filogenética de los datos combinados fue examinada bajo el criterio de MP utilizando la prueba de incongruencia en la diferencia del tamaño de los árboles (Incongruence Length Difference test, ILD) (Farris et. al. 1995) implementada en el programa PAUP 4.10b utilizando una búsqueda heurística con 1000 réplicas de particiones y 10 adiciones de secuencias al azar. La congruencia también fue evaluada con la prueba de Rodrigo (1993) comparando la distancia simétrica (SD), observada entre los árboles

consenso, implementada en PAUP 4.10b, con la SD crítica ($\alpha \leq 0.05$) de árboles generados mediante bootstrapping, con 100 pseudoréplicas por duplicado por cada gen. La incongruencia fue considerada como significativa si el valor de SD observado fue mayor al valor crítico, considerando el 95% de las comparaciones entre las pseudoréplicas.

III.1.5.5. Intervalos del 95% confianza de la similitud intra- y entra-géneros

Se construyó una matriz de similitud con el alineamiento de cada uno de los tres genes cromosomales utilizando el programa BIOEDIT v.5 (Hall, 1999). Se obtuvo el valor promedio de similitud y la varianza dentro y entre los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*. Se construyeron intervalos con el 95% de confianza para las similitudes y la diferencia significativa del promedio de las similitudes entre géneros se estimó a partir de la prueba estadística de t de Student. Las especies de *Sinorhizobium* asignadas como grupo IV (*Ensifer adhaerens* y *S. morelense*) en los árboles filogenéticos, se consideraron como un grupo aparte del resto de especies de *Sinorhizobium* para establecer las comparaciones.

III.2 Resultados

III.2.1 Patrones de hibridación *nolR*

El gen *nolR* se encontró presente en todas las especies de *Sinorhizobium* en una sola copia (fig. III.2.1B). Especies relacionadas como *S. americanum*, *S. fredii* y *S. xinjiangense* que formaron al grupo I por el criterio filogenético (cap III.2.5) mostraron patrones similares (fig. III.2.1B) y lo mismo ocurrió para *E. mexicanus* y *S. teranga* como grupo III (fig. III.2.1D). La señal de hibridación con menor intensidad en *S. morelense* y *E. adhaerens* no se atribuyó a la diferencia en la cantidad de DNA transferida a la membrana sino a una menor similitud con el resto de especies de *Sinorhizobium*. Cuando la sonda utilizada provino de *Sinorhizobium*, sólo existió señal positiva de hibridación en *Sinorhizobium* y estuvo ausente en las cepas de *Rhizobium*, *Brucella* y *Ochrobactrum* (fig. III.2B) y en la hibridación cruzada utilizando como sonda a *Rhizobium etli* CFN42 contra la misma membrana, solamente ocurrió señal de hibridación con su homólogo y con ninguna otra especie de *Sinorhizobium* ni los otros dos géneros incluidos (fig. III.2.C). Este ensayo fue incluido en Toledo et al. (2003) como una propuesta de herramienta útil para la diferenciación de las especies de *Sinorhizobium*.

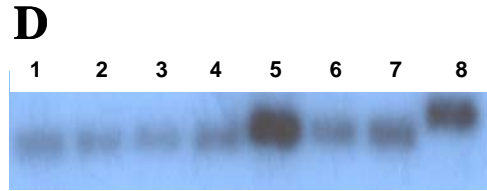
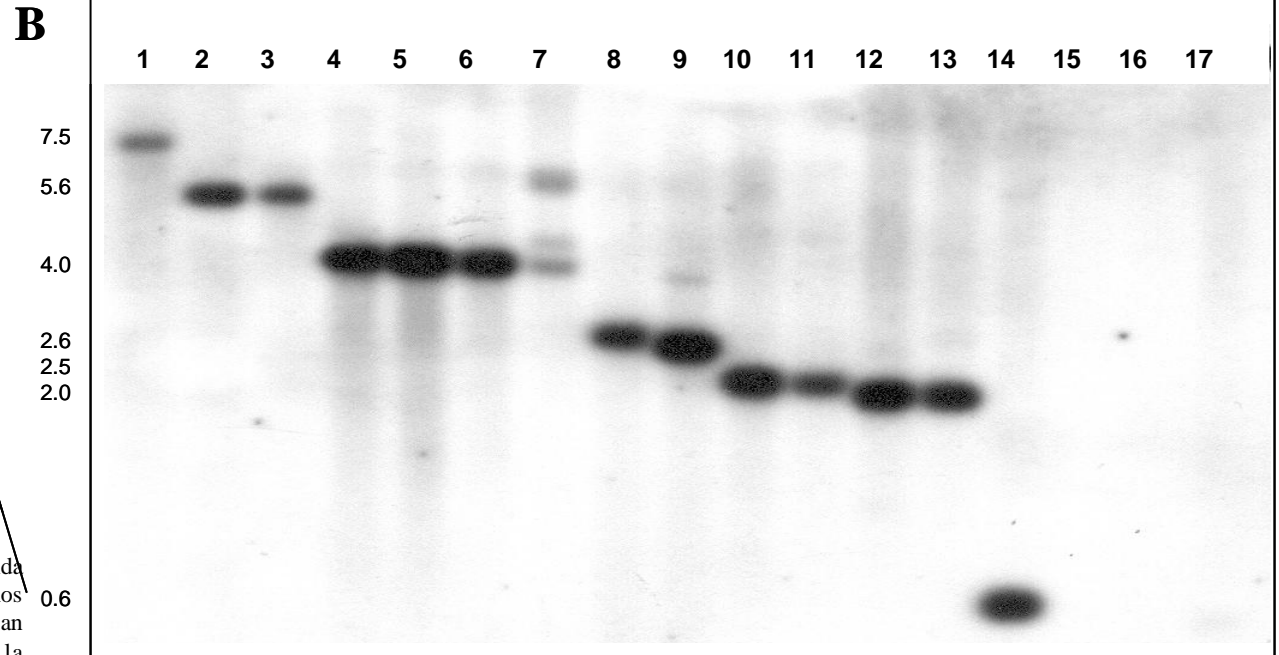
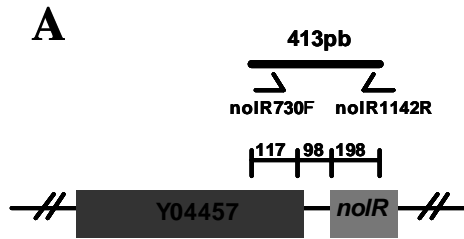


Fig.IV.2.1 Patrones de hibridación *nolR*.

Hibridación tipo Southern utilizando como sonda marcada con ^{32}P el producto de PCR obtenido con los oligos SmnolR730F y SmnolR1142R que amplifican un fragmento de *nolR* de 413 pb que comprenden la mitad 5' del gen (199 pb) y una región corriente arriba de 214 pb de *S. meliloti* incluye parte de otro ORF designado YO4457 en el genoma de *S. meliloti* 1021 contra el DNA total restringido con *Eco* RI de las especies descritas de *Sinorhizobium* y un representante de sus generos más cercanos, *Ensifer*, *Ochrobactrum* y *Rhizobium*. Orden en el gel: 1 *Ensifer adhaerens* ATCC 33499, 2, *S. medicae* A321, 3. *Sinorhizobium* sp. NGR234, 4. *S. meliloti* Rm41, 5. *S. meliloti* 1021, 6. *S. kostiense* HAMB1 1489, 7. *S. morelense* Lc04, 8. *S. saheli* ORS 611, 9. *S. arboris* HAMB1 1552, 10. *S. xinjiangense* CCBAU 110, 11. *S. fredii* USDA 205, 12. *S. americanum* CFN EI156, 13. *S. americanum* CFN EI154, 14. *S. teranga*e ORS 51, 15. *Ochrobactrum anthrhopi* LMG3331, 16. *Brucella melitensis* M6, 17. *Rhizobium etli* CFN42. A. Diseño de oligos nolR730F and nolR1142RAL591688.1)B. Sonda *Sinorhizobium meliloti* 1021. C. sonda *Rhizobium etli* CFN42. D. sonda *S. mexicanum* ITTG R7, orden en el gel: 1. *S. teranga*e ORS1009, 2.ORS1073, 3. ORS19,4. ORS604, 5. *S. mexicanum* ITTG R7, 6. ITTG R4 , 7. CFN ESH1, 8. *Sinorizobium* sp. ITTG S70



III.2.2 Saturación de las terceras posiciones

No se encontró saturación significativa de la sustitución en las terceras posiciones del codón en ninguno de los genes cromosomales *gyrA*, *recA*, *rpoB* ni en el plasmídico *nodA* puesto que el índice de saturación observado (I_{ss_o}) fue menor al índice de saturación crítico (I_{ss_c}) en todos los casos ($I_{ss_o} < I_{ss_c}$; $P < 0.001$) (tabla III.2.2). Por lo tanto, las terceras posiciones no fueron excluidas en los análisis filogenéticos.

Tabla. III.2.2 Índice de saturación de Xia y Xie (2002) para las terceras posiciones del codon.

gen	I_{ss} observado (I_{ss})	I_{ss} crítico ($I_{ss c}$)	Resultado	Conclusión
<i>gyrA</i>	0.528	0.775	$I_{ss} < I_{ss c}$	poca saturación
<i>recA</i>	0.477	0.773	$I_{ss} < I_{ss c}$	poca saturación
<i>rpoB</i>	0.433	0.778	$I_{ss} < I_{ss c}$	poca saturación
<i>nodA</i>	0.473	0.761	$I_{ss} < I_{ss c}$	poca saturación

Interpretación de la prueba: Si $I_{ss} < I_{ss.c}$, ($p < 0.001$), entonces existe poca saturación. De modo contrario, si $I_{ss} > I_{ss.c}$ ($p < 0.001$) entonces la saturación es significativa y no es útil para proporcionar señal filogenética.

VI.2.3 Selección del mejor modelo evolutivo para los alineamientos múltiples.

Las características básicas de las secuencias de los alineamientos múltiples de los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB* y el gen plasmídico *nodA* se presentan en la tabla III.2.3.1, y las estimaciones de las tasas de cambio de los parámetros obtenidos bajo los mejores modelos evolutivos en la tabla III.2.3.2. Las frecuencias de nucleótidos fueron mayores para G y C que para las otras dos bases como era de esperarse debido a que el contenido de G+C en rhizobia es típicamente del 60%. Se observó una inclinación hacia las sustituciones transicionales, principalmente entre las pirimidinas (C-T).

Tabla III.2.3.1 Características básicas de los alineamientos de las secuencias de los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB* y sus combinaciones, y del gen plasmídico *nodA*.

Gen	Num. secuencias	Num. haplotipos	Longitud del alineamiento	Num. sitios conservados	Num. sitios variables	Num. sitios parsimonia informativos
<i>gyrA</i>	61	47	528	240	288	228
<i>recA</i>	61	47	450	251	199	172
<i>rpoB</i>	61	44	672	357	315	272
<i>gyrA-recA</i>	61	50	978	491	487	401
<i>gyrA-rpoB</i>	61	51	1200	597	603	502
<i>recA-rpoB</i>	61	51	1122	608	514	447
<i>gyrA-recA-rpoB</i>	61	54	1650	848	802	676
<i>nodA</i>	83	71	498	120	375	356

Tabla III.2.3.2 Estimación de las frecuencias y tasas de los parámetros con ML bajo el mejor modelo seleccionado a partir de la prueba de cocientes de η LTRs y AIC para los genes cromosomales *gyrA*, *recA* *rpoB* y el plasmídico *nodA*.

Gen	Frecuencia de las bases (π A,C,G,T)	Tasa de la matriz	Proporción de sitios invariables (I)	Parámetro α de la distribución Gama	Mejor Modelo Evolutivo η LTR	Mejor Modelo Evolutivo AIC
<i>gyrA</i>	A=0.1697 C=0.3855 G=0.3230 T=0.1218	[A-C]=0.8507 [A-G]=2.3107 [A-T]=1.0013 [C-G]=1.1964 [C-T]=6.9444 [G-T]=1.0000	0.3475	0.8046	GTR+I+ Γ -lnL=6090.2471	TIM+I+ Γ -lnL=6090.642 AIC=12197.28 TrN+I+ Γ -lnL=6092.1006 AIC=12198.20
<i>recA</i>	A=0.1726 C=0.3376 G=0.3524 T=0.1373	[A-C]=0.4045 [A-G]=2.8485 [A-T]=0.2555 [C-G]=0.6955 [C-T]=6.8567 [G-T]=1.0000	0.5224	1.514	GTR+I+ Γ -lnL=4452.8589	GTR+I+ Γ -lnL=4452.8589 AIC=8925.71 TrN+I+ Γ -lnL=4459.61 AIC=8933.22
<i>rpoB</i>	A=0.1701 C=0.3472 G=0.3291 T=0.1536	[A-C]=0.8600 [A-G]=1.6576 [A-T]=0.7738 [C-G]=0.8342 [C-T]=4.2094 [G-T]=1.0000	0.4449	1.0289	GTR+I+ Γ -lnL=6504.5122	TrN+I+ Γ -lnL=6505.2241 AIC=13024.44 TIM+I+ Γ -lnL=6504.8101 AIC=13025.62
<i>nodA</i>	A=0.1862 C=0.2921 G=0.3057 T=0.2160	[A-C]=1.8319 [A-G]=5.2764 [A-T]=1.3710 [C-G]=1.4761 [C-T]=5.2764 [G-T]=1.0000	0.2092	1.3417	HKY+I+G -lnL=11827.2236	TVM+I+ Γ -lnL=11819.1641 AIC=23656.3281 GTR+I+ Γ -lnL=11818.7373 AIC=23657.4746

El mejor modelo bajo el criterio de η LTR fue GTR+I+ Γ para los tres genes cromosomales con funciones informativas. Bajo el criterio AIC solo el gen *recA* obtuvo este modelo, y para *gyrA* y *rpoB* los mejores modelos fueron TIM+I+ Γ y TrN+I+ Γ respectivamente. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron los modelos obtenidos con AIC por ser los más simples. El modelo TrN+I+ Γ fue utilizado para *gyrA* debido a que TIM+I+ Γ no está implementado en el programa PhyML y su puntuación AIC estuvo muy cerca. Para el gen plasmídico *nodA* el mejor modelo evolutivo fue TVM+I+ Γ pero la inferencia filogenética con ML fue construida con el modelo GTR+I+ Γ que fue el modelo más próximo al óptimo implementado en PhyML. La consideración de la tasa de variación entre sitios (Γ) mejoró los modelos evolutivos en todos los casos así como la consideración de la proporción de sitios invariables (I).

III.2.4 Análisis de congruencia de las filogenias de los genes *gyrA*, *recA* y *rpoB*

Para los análisis de congruencia, el grupo externo fue *Mesorhizobium* en lugar de *B. japonicum* USDA 110 debido a que el número de MPTs se redujo de 138 a 9 (figs. III.2.5.1B1 y B2). Todas las combinaciones de datos evaluadas bajo el criterio de MP con la prueba ILD fueron significativamente incongruentes. Sin embargo, la evaluación de la diferencia de las topologías comparando la distancia simétrica (SD) con la prueba de Rodrigo, fue no significativa. ($\alpha \leq 0.05$). Los resultados de esta prueba se muestran en la (tabla III.2.4 y Fig.III.2.4.2). Con 79,800 comparaciones para las 100 pseudoréplicas (x2) de los genes combinados por pares *.recA+gyrA*, *recA+rpoB*, *rpoB+gyrA* se obtuvo un valor crítico=3,990 para una $\alpha=0.5$ (95% de las observaciones).

Tabla III.2.4. Resultados de congruencia de topologías para la combinación de las secuencias de los genes *recA*, *gyrA* y *rpoB* combinados por pares con la prueba de Rodrigo et al. 1993.

Combinación de genes	SD observada	Incongruencia con el 95% de confianza		
		^a . <i>recA+gyrA</i>	<i>recA+rpoB</i>	<i>rpoB+gyrA</i>
<i>recA-gyrA</i>	46	^b NS	NS	NS
<i>recA-rpoB</i>	55	NS	NS	NS
<i>rpoB-gyrA</i>	41	NS	NS	NS

^a El número de comparaciones=79,800 para las 100 pseudoréplicas (x2) de los genes combinados por pares *.recA+gyrA*, *recA+rpoB*, *rpoB+gyrA*, valor crítico=3,990 para $\alpha=0.5$

^b NS = no significativa.

La figura III.2.4 muestra la frecuencia de árboles generados por bootstraps en función de los intervalos de SD. El SD observado de todas las topologías combinadas por pares fue menor al valor crítico de SD obtenido de la combinación pareada de los árboles generados mediante bootstraps. Por lo tanto, según la prueba de Rodrigo, las topologías de los genes *gyrA*, *recA* y *rpoB* no fueron incongruentes.

Fig. III.2.4.1 Prueba de Rodrigo et al. 1993.

A

```

-----
2.00- 2.99 | (1)
3.00- 3.99 | (0)
4.00- 4.99 | (0)
5.00- 5.99 | (2)
6.00- 6.99 | (2)
7.00- 7.99 | (3)
8.00- 8.99 | (6)
9.00- 9.99 | (11)
10.00-10.99 | (23)
11.00-11.99 | # (35)
12.00-12.99 | # (58)
13.00-13.99 | ## (84)
14.00-14.99 | ## (113)
15.00-15.99 | ### (150)
16.00-16.99 | ##### (244)
17.00-17.99 | ##### (312)
18.00-18.99 | ##### (430)
19.00-19.99 | ##### (545)
20.00-20.99 | ##### (748)
21.00-21.99 | ##### (852)
22.00-22.99 | ##### (1145)
23.00-23.99 | ##### (1274)
24.00-24.99 | ##### (1513)
25.00-25.99 | ##### (1688)
26.00-26.99 | ##### (2003)
27.00-27.99 | ##### (2085)
28.00-28.99 | ##### (2339)
29.00-29.99 | ##### (2291)
30.00-30.99 | ##### (2544)
31.00-31.99 | ##### (2252)
32.00-32.99 | ##### (2307)
33.00-33.99 | ##### (2064)
34.00-34.99 | ##### (2104)
35.00-35.99 | ##### (1804)
36.00-36.99 | ##### (1664)
37.00-37.99 | ##### (1416)
38.00-38.99 | ##### (1304)
39.00-39.99 | ##### (1155)
40.00-40.99 | ##### (1026)
41.00-41.99 | ##### (929)
42.00-42.99 | ##### (823)
43.00-43.99 | ##### (926)
44.00-44.99 | ##### (983)
45.00-45.99 | ##### (1300)
46.00-46.99 | ##### (1498) ← recA-gyrA SDI=46
47.00-47.99 | ##### (1909)
48.00-48.99 | ##### (2259)
49.00-49.99 | ##### (2603)
50.00-50.99 | ##### (2834)
51.00-51.99 | ##### (3287)
52.00-52.99 | ##### (3203)
53.00-53.99 | ##### (3332)
54.00-54.99 | ##### (3110)
55.00-55.99 | ##### (2864)
56.00-56.99 | ##### (2531)
57.00-57.99 | ##### (2188)
58.00-58.99 | ##### (1683)
59.00-59.99 | ##### (1360)
60.00-60.99 | ##### (981)
61.00-61.99 | ##### (701)
62.00-62.99 | ##### (432)
63.00-63.99 | ##### (260)
64.00-64.99 | ## (112)
65.00-65.99 | # (50)
66.00-66.99 | # (29)
67.00-67.99 | (10)
68.00-68.99 | (4)
69.00-69.99 | (2)
-----

```

Fig. III.2.4 Prueba de Rodrigo et al. 1993.

Distribución de la diferencia de las distancias simétricas (SD) entre los árboles generados mediante bootstrapping en función de los intervalos de SD bajo el criterio de MP implementado en PAUP v 4.10b. El número de comparaciones=79,800 para las 100 pseudoréplicas por duplicado de los genes combinados por pares *.recA+gyrA*, *recA+rpoB*, *rpoB+gyrA*. Valor crítico=3,990 para $\alpha=0.5$. Como grupo externo se utilizó a *Mesorhizobium*. La gráfica representa la frecuencia de árboles en función de los intervalos de distancia. La distancia mínima de cada intervalo es 1.99. Entre paréntesis se indican las frecuencias de árboles. En gris se indica la zona de rechazo de congruencia con el 95% de confianza ($\alpha=0.5$). Las flechas muestran el valor observado de SD entre las parejas de topologías comparadas. A. *recA+gyrA*, B. *recA+rpoB*, C. *rpoB+gyrA*. Las flechas indican el valor observado de SD.

B

```
-----  
3.00- 3.99 | (1)  
4.00- 4.99 | (0)  
5.00- 5.99 | (2)  
6.00- 6.99 | (4)  
7.00- 7.99 | (11)  
8.00- 8.99 | (21)  
9.00- 9.99 | (32)  
10.00-10.99 | # (50)  
11.00-11.99 | # (84)  
12.00-12.99 | ## (124)  
13.00-13.99 | ### (189)  
14.00-14.99 | #### (283)  
15.00-15.99 | ##### (408)  
16.00-16.99 | ##### (563)  
17.00-17.99 | ##### (753)  
18.00-18.99 | ##### (926)  
19.00-19.99 | ##### (1210)  
20.00-20.99 | ##### (1464)  
21.00-21.99 | ##### (1700)  
22.00-22.99 | ##### (2003)  
23.00-23.99 | ##### (2045)  
24.00-24.99 | ##### (2123)  
25.00-25.99 | ##### (2118)  
26.00-26.99 | ##### (2166)  
27.00-27.99 | ##### (1881)  
28.00-28.99 | ##### (1920)  
29.00-29.99 | ##### (1675)  
30.00-30.99 | ##### (1722)  
31.00-31.99 | ##### (1442)  
32.00-32.99 | ##### (1543)  
33.00-33.99 | ##### (1321)  
34.00-34.99 | ##### (1447)  
35.00-35.99 | ##### (1217)  
36.00-36.99 | ##### (1203)  
37.00-37.99 | ##### (1041)  
38.00-38.99 | ##### (1052)  
39.00-39.99 | ##### (922)  
40.00-40.99 | ##### (773)  
41.00-41.99 | ##### (644)  
42.00-42.99 | ##### (483)  
43.00-43.99 | ##### (463)  
44.00-44.99 | ##### (391)  
45.00-45.99 | ##### (451)  
46.00-46.99 | ##### (496)  
47.00-47.99 | ##### (673)  
48.00-48.99 | ##### (981)  
49.00-49.99 | ##### (1410)  
50.00-50.99 | ##### (1955)  
51.00-51.99 | ##### (2645)  
52.00-52.99 | ##### (3445)  
53.00-53.99 | ##### (4154)  
54.00-54.99 | ##### (4714)  
55.00-55.99 | ##### (4938) ◀ recA-rpoB SDI=55  
56.00-56.99 | ##### (4353)  
57.00-57.99 | ##### (3396)  
58.00-58.99 | ##### (2500)  
59.00-59.99 | ##### (1741)  
60.00-60.99 | ##### (1053)  
61.00-61.99 | ##### (680)  
62.00-62.99 | ##### (365)  
63.00-63.99 | ### (231)  
64.00-64.99 | # (90)  
65.00-65.99 | # (68)  
66.00-66.99 | (26)  
67.00-67.99 | (12)  
68.00-68.99 | (2)  
69.00-69.99 | (1)  
-----
```

C

```
-----  
2.00- 2.99 | (1)  
3.00- 3.99 | (1)  
4.00- 4.99 | (0)  
5.00- 5.99 | (4)  
6.00- 6.99 | (4)  
7.00- 7.99 | (14)  
8.00- 8.99 | (19)  
9.00- 9.99 | # (37)  
10.00-10.99 | # (67)  
11.00-11.99 | ## (117)  
12.00-12.99 | ### (146)  
13.00-13.99 | #### (237)  
14.00-14.99 | ##### (348)  
15.00-15.99 | ##### (496)  
16.00-16.99 | ##### (703)  
17.00-17.99 | ##### (937)  
18.00-18.99 | ##### (1176)  
19.00-19.99 | ##### (1529)  
20.00-20.99 | ##### (1862)  
21.00-21.99 | ##### (2200)  
22.00-22.99 | ##### (2550)  
23.00-23.99 | ##### (2699)  
24.00-24.99 | ##### (2790)  
25.00-25.99 | ##### (2846)  
26.00-26.99 | ##### (2798)  
27.00-27.99 | ##### (2681)  
28.00-28.99 | ##### (2471)  
29.00-29.99 | ##### (2247)  
30.00-30.99 | ##### (2070)  
31.00-31.99 | ##### (1824)  
32.00-32.99 | ##### (1662)  
33.00-33.99 | ##### (1680)  
34.00-34.99 | ##### (1715)  
35.00-35.99 | ##### (1955)  
36.00-36.99 | ##### (2249)  
37.00-37.99 | ##### (2800)  
38.00-38.99 | ##### (3172)  
39.00-39.99 | ##### (3431)  
40.00-40.99 | ##### (3840)  
41.00-41.99 | ##### (3931) ← rpoB-gyrA SDI=41  
42.00-42.99 | ##### (3769)  
43.00-43.99 | ##### (3433)  
44.00-44.99 | ##### (2956)  
45.00-45.99 | ##### (2431)  
46.00-46.99 | ##### (1860)  
47.00-47.99 | ##### (1335)  
48.00-48.99 | ##### (995)  
49.00-49.99 | ##### (655)  
50.00-50.99 | ##### (422)  
51.00-51.99 | ##### (266)  
52.00-52.99 | ### (152)  
53.00-53.99 | # (80)  
54.00-54.99 | # (55)  
55.00-55.99 | # (35)  
56.00-56.99 | (24)  
57.00-57.99 | (14)  
58.00-58.99 | (5)  
59.00-59.99 | (3)  
60.00-60.99 | (0)  
61.00-61.99 | (1)  
-----
```

III.2.5 Inferencia filogenética con los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB*.

La inferencia filogenética basada en la comparación de las secuencias de los genes cromosomales informativos *gyrA*, *recA* y *rpoB* construída con el mejor modelo evolutivo y bajo los tres criterios MP, ML y MB y se muestra en las figuras III.2.5.1-3. Debido a la proximidad de de *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, y de estos dos géneros con *Mesorhizobium*, se escogió como grupo externo a *Bradyrhizobium japonicum*. En todas las filogenias construidas, las topologías muestran tres géneros bien definidos, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* con valores de soporte superiores al 50% de los bootstraps para MP y ML, y con probabilidades posteriores cercanas a 1.00 para MB, siendo *Sinorhizobium* y *Rhizobium* los géneros más cercanos.

Las relaciones dentro del género *Sinorhizobium* muestran especies que permanecieron juntas (salvo algunas excepciones), especies que se entremezclan, y cepas, especies y grupos cuya posición fue variable en la mayoría de las filogenias. Las especies que conservaron su agrupamiento fueron asignadas a cuatro grupos: I.- *S. fredii*-*S. xinjiangense*-*S. americanum*, II.- *S. melilot* -*S. medicae*-*S. arboris*, III.- *S. teranga*-*E. mexicanus* y IV.- *S. ahaerens*-*S. morelense*. Las posiciones variables se presentaron en *S. fredii* USDA 257, *Sinorhizobium* sp. NGR234, *S. kostiense*, *S. saheli*, y el grupo IV. Las relaciones entre los cuatro grupos también fue variable, pero en la mayoría de los casos los grupos I, II y III compartieron el mismo ancestro, y el grupo IV se ubicó como el grupo más lejano, principalmente en las filogenias combinadas.

Varias cepas de las especies de *S. fredii* y *S. xinjiangense* se entremezclaron. o fueron idénticas para el gen *rpoB* como fue el caso de *S. xinjiangense* CCBAU110 y *S. fredii* USDA205. *S. americanum* permaneció como la especie más cercana a *S. fredii*-*S. xinjiangense* formando al grupo I que se mantuvo bien soportado en todas las filogenias bajo el criterio de MB, en los otros

criterios, solamente mostró valores altos con los datos combinados a excepción de *gyrA+rpoB* bajo los criterios de MP (<50%) y ML (53%). La posición de *S. fredii* USDA 257 no se mantuvo dentro del clado de su especie ni del grupo I en las filogenias de *rpoB*, bajo todos los criterios se agrupó con el grupo IV. En un árbol adicional para este gen construido con MB sin incluir al grupo IV, tampoco se recuperó su afiliación al grupo I.

S. meliloti y *S. medicae* permanecieron como especies hermanas con valores de soporte altos en todas las filogenias. *S. arboris* se afilió a estas dos especies para conformar al grupo II que estuvo bien soportado en las filogenias de los genes *gyrA* y *recA* (>93% para MP y ML, y 1.0 para MB). La filogenia del gen *rpoB* fue incongruente con la de los genes *gyrA* y *recA* bajo los criterios MP y ML en que *S. arboris* se agrupó con el grupo IV. La afiliación de *S. arboris* al grupo II se recuperó cuando *rpoB* se combinó con cualquiera de los otros dos genes.

S. teranga y los dos linajes aislados de *Acacia angustissima*, uno de ellos el que corresponde a la nueva especie *Ensifer mexicanus* (cap. IV) permanecieron juntos como parientes cercanos en un mismo clado muy bien soportado en todas las filogenias, casi siempre con valores de soporte del 100% y una probabilidad posterior de 1.0.

En las combinaciones en que *rpoB* participó, la posición de *S. saheli* fue variable. Su agrupamiento con *S. kostiense* y grupo II fue la más frecuente bajo el criterio de ML pero con valores de soporte bajos. La combinación *gyrA+recA* mejoró el soporte de esta relación con valores de soporte del 80% con MP, 63% con ML y con una probabilidad posterior de 0.95 con MB.

S. kostiense tuvo como parientes más cercanos a las especies del grupo II y a *S. saheli* en las filogenias individuales de los genes *gyrA* y *recA* que al concatenarse aumentaron el valor de

soporte de esta relación bajo los criterios de MP y MB. El gen *rpoB* relacionó a *S. kostiense* con el grupo III en todas las filogenias individuales, sin embargo, en la combinación triple *gyrA+recA+rpoB* con MB se mantuvo su relación con el grupo II como pariente más cercano con una probabilidad posterior de 0.94.

Los cuatro grupos de *Sinorhizobium* se mantuvieron unidos como un linaje independiente de *Rhizobium* en las filogenias individuales de *recA* y *rpoB*, y en todas las combinaciones a excepción del criterio de MP cuando *gyrA* estuvo presente en las dobles combinaciones. Bajo el criterio de MB, en el árbol individual de *gyrA*, el grupo IV se afilió al género *Rhizobium* como pariente más cercano con una probabilidad posterior baja (0.63) en vez de hacerlo con alguno de los tres grupos restantes de *Sinorhizobium*. Sin embargo, en una filogenia adicional construida con el gen *gyrA* con este mismo criterio sin incluir al grupo IV, el agrupamiento de I, II y III se recupera como grupo monofilético con una probabilidad posterior alta (0.99). El grupo IV se mantuvo como el grupo más alejado de los otros tres con valores de soporte más altos que el clado que agrupó a los grupos I, II y III, que corresponden a los linajes de las especies que se afiliaban dentro del género *Sinorhizobium* antes de su fusión con el género *Ensifer* (grupo IV). La cohesión de I, II y III no ocurrió en las filogenias individuales bajo el criterio de MP, y sólo estuvo bien soportada con *recA* bajo los criterios ML (69%) y MB (0.94). En las filogenias combinadas, el agrupamiento de I, II y III se recupera para MP cuando el gen *recA* formó parte de la combinación pero con valores de soporte <50%. Con los criterios de ML y MB este agrupamiento estuvo bien soportado (60-94% y 1.00 respectivamente) a excepción de la combinación *gyrA+rpoB* con MB debido a que el gen *rpoB* favoreció el agrupamiento del grupo IV con el grupo II pero con una probabilidad posterior baja (0.52).

En las filogenias individuales de *rpoB* y todas las combinaciones dobles en que este gen participó, a excepción de su combinación con *gyrA* bajo los criterios de ML y MB, las especies incluidas del género *Rhizobium* no permanecieron como un solo grupo. Las especies *R. huatlense*, *R. galegae* y *Agrobacterium tumefaciens*, se separaron del resto de especies de *Rhizobium* como grupo independiente.

En la fig. III.2.5.4 se muestra una esquematización que pretende resumir las topologías obtenidas en las figuras III.2.5.1-3. En la mayoría de las filogenias el grupo IV es el más alejado de los otros tres grupos de *Sinorhizobium* que podría ser considerado con un ancestro distinto al resto de especies de *Sinorhizobium* (fig. III.2.5.2.4A y B). El gen *gyrA* favoreció el alejamiento del grupo IV del resto e incluso llega a ser el grupo hermano de *Rhizobium* bajo el criterio de MB (III.2.5.2.4G), pero cuando el grupo IV es excluido, los grupos I, II, y III se recuperaron como clado bien soportado (III.2.5.2.4F). Por el contrario, el gen *rpoB* favoreció el agrupamiento del grupo IV con el grupo II (III.2.5.2.4C y E). A excepción de la combinación triple y su combinación con *gyrA*, el gen *rpoB* dividió al clado *Rhizobium-Agrobacterium* en dos grupos, siendo el más alejado de *Sinorhizobium* el grupo que contiene a *Agrobacterium* (III.2.5.2.4B y C). El gen *recA* favoreció la cohesión de I, II y III, la posición del grupo IV como un grupo y la separación de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* como dos grupos monofiléticos independientes. *Mesorhizobium* se mantuvo siempre como grupo monofilético y el más lejano de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

Las filogenias combinadas aumentaron el soporte y alcanzaron valores de bootstraps > 70% o de probabilidades posteriores > 0.75 en la mayoría de los nueve nodos que agruparon a los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*, las divisiones entre *Sinorhizobium* y *Rhizobium* y los grupos al interior de *Sinorhizobium* (fig. III.2.5.5, tabla III.2.5.1). A excepción de la

combinación *gyrA+rpoB* bajo el criterio de MP, más del 70% de los nodos alcanzaron estos valores en las combinaciones dobles, y el 100% se alcanzó en la combinación doble *gyrA+recA* y la triple *gyrA+recA+rpoB* bajo los criterios ML y MB.

Para MP los valores de CI estuvieron dentro de un rango de 0.375 y 0.412 y para RI entre 0.660 y 0.708 (fig III.2.5.1). Siendo 1 el mayor valor alcanzado para el modelo hipotético de la ausencia total de homoplasia (Farris 1989), la homoplasia fue un componente presente en todas las filogenias de MP. El mayor número de árboles más parsimoniosos fue mucho mayor en el gen *recA* (138), sin embargo, en una filogenia adicional, en donde se cambió de grupo externo a *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 por *Mesorhizobium*, el número de árboles se redujo considerablemente hasta nueve sin alterar las relaciones entre los grupos (fig. III.2.5.1B1 y B2).

Las cepas de *Sinorhizobium* sp. incluidas en las filogenias cuya especie aun no ha sido determinada, se agruparon dentro de los grupos I y III. Las cepas aisladas de nódulos *Acacia angustissima* en Chiapas y de suelos de la Sierra de Huautla México con este mismo hospedero como planta trampa, representaron un nuevo linaje que se agrupó con *S. terangaie* como su pariente más cercano para formar el grupo III que siempre estuvo bien soportado en todas las filogenias. Este nuevo linaje fue propuesto para la descripción de una nueva especie con el nombre de *Ensifer mexicanus* (Lloret et al. 2007, cap IV de esta tesis). Además de las cepas de *E. mexicanus*, cuatro cepas de Chiapas (ITTG S68, ITTG S70, ITTG S71 y ITTG R11) con secuencias idénticas entre sí, pero con perfiles ERIC distintos (datos no mostrados) que no se encontraron en la Sierra de Huautla, podrían representar otro posible nuevo linaje dentro del grupo III.

Las cepas de *Sinorhizobium* sp Lc39 y Lc56 aisladas en Morelos, México (Wang et al 1999) y *Sinorhizobium* sp. BR816 en Brasil (van Rhijn et al. 1994) de nódulos de *Leucaena leucocephala*, se agruparon como parientes cercanos de *S. americanum*. La cepa de amplio rango de hospedero NGR234 aislada de *Lablab purpureus* en Papua Nueva Guinea, (Trinick 1980) se agrupó también dentro del grupo I, siendo sus parientes más cercanos *S. fredii* y *S. xinjiangense*. La excepción se presentó en las filogenias individuales del gen *recA* bajo los tres criterios en que se afilió al grupo III bajo los criterios de ML(72%) y MB (0.78), y con III-IV con MP (<50%). En las filogenias combinadas su relación con *S. fredii*-*S. xinjiangense* estuvo bien soportada. También la posición de la cepa GRX8 aislada de *Phaseolus vulgaris* en Europa (Laguerre et al. 2001) se afilió al grupo I cerca de *S. fredii*-*S. xinjiangense*.

Fig. III.2.5.1.A1

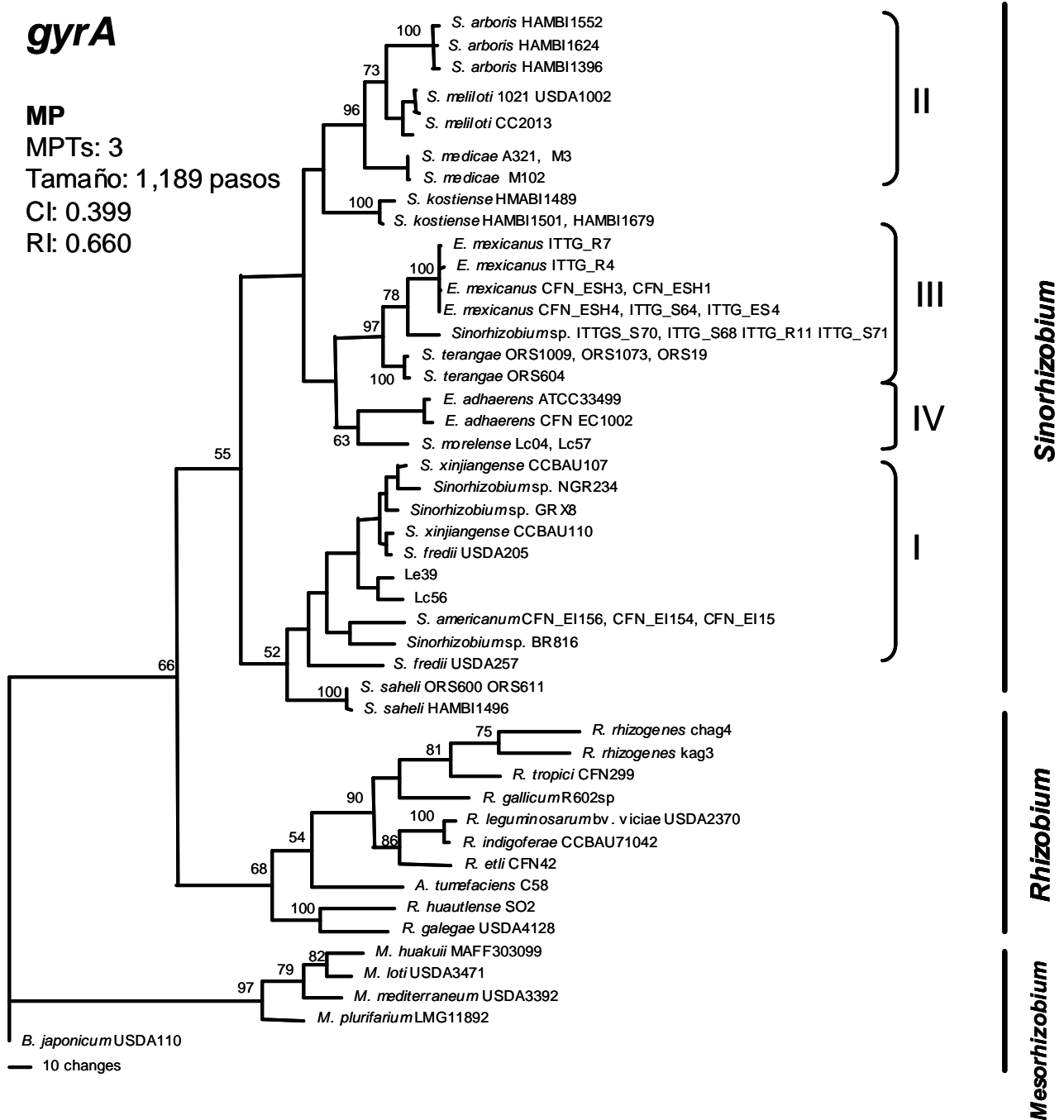


Fig. III.2.5.1 Árboles filogenéticos de las secuencias parciales de los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB* y sus posibles combinaciones bajo el criterio de MP. Las posiciones del alineamiento se indican en cap. III fig. 1, y las características de las secuencias se muestran en la tablas III.2.3.1. *gyrA*, B *recA*, C. *rpoB*, D. *gyrA+recA*, E. *recA+rpoB*, F. *gyrA+rpoB*, G. *gyrA+recA+rpoB*. El grupo externo fue *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 en todos los casos excepto en B2 que fue *Mesorhizobium* y *B. japonicum* fue excluido para disminuir el número de árboles mas parsimoniosos (MPTs) de 138 a 9. CI= índice de consistencia, RI=Índice de retención.

Fig. III.2.5.1.B1

recA

MP

MPTs: 138

Tamaño: 840 pasos

Cl: 0.375

Rl: 0.670

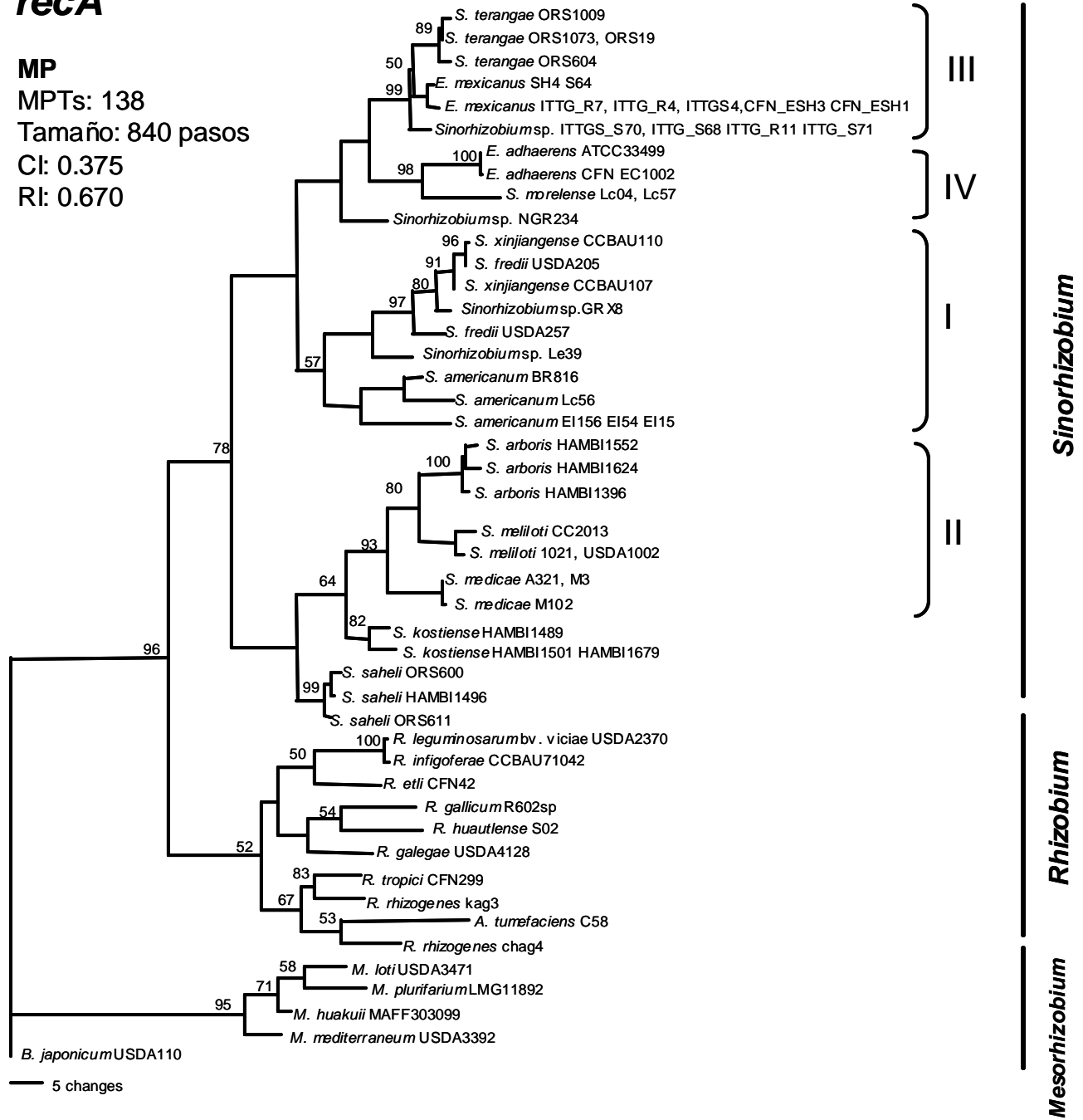


Fig. III.2.5.1.B2

recA

MP

MPTs: 9

Tamaño: 778 pasos

CI: 0.375

RI: 0.757

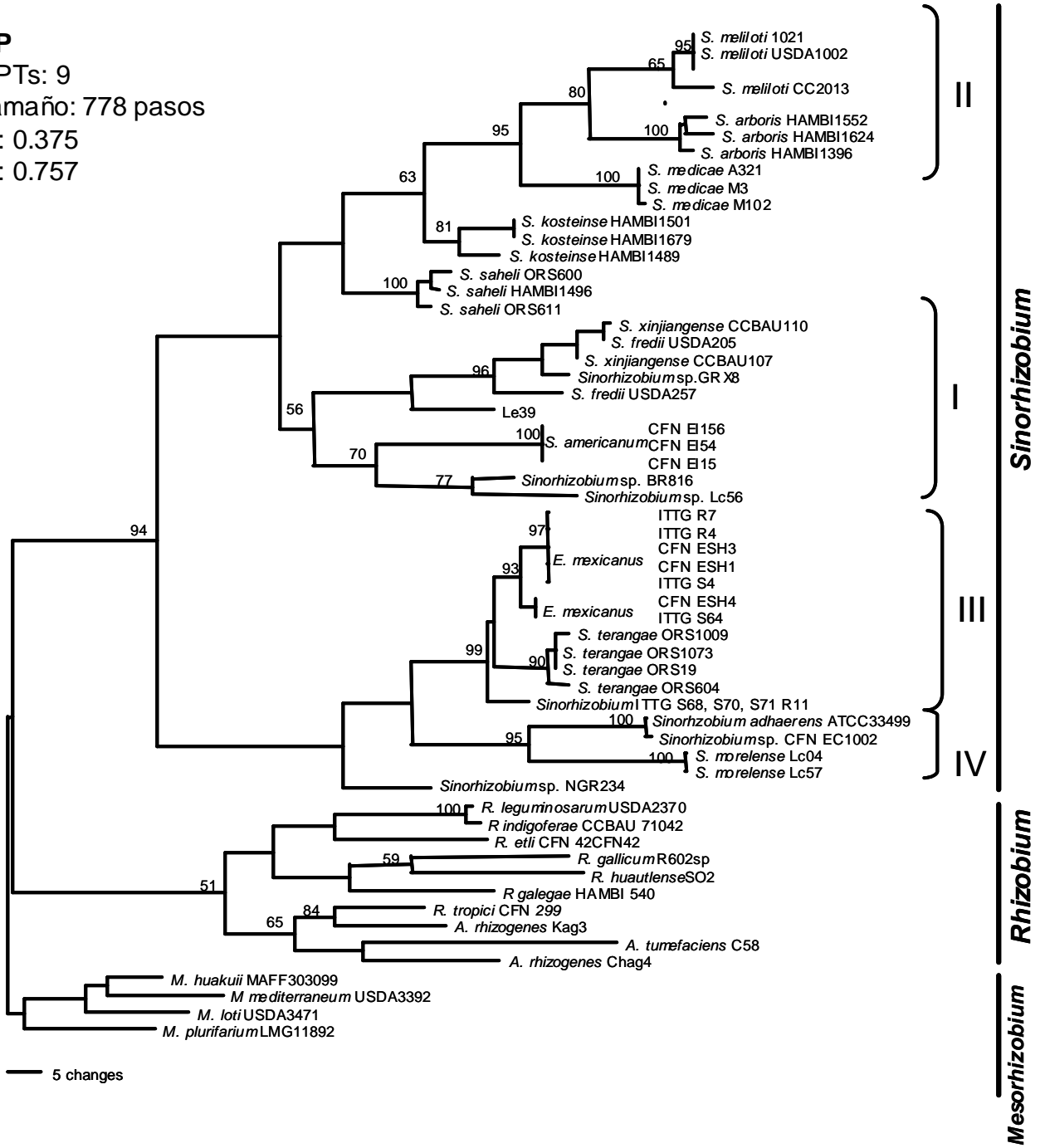


Fig. III.2.5.1C

rpoB

MP
MPTs: 5
Tamaño: 1,182 pasos
CI: 0.442
RI: 0.704

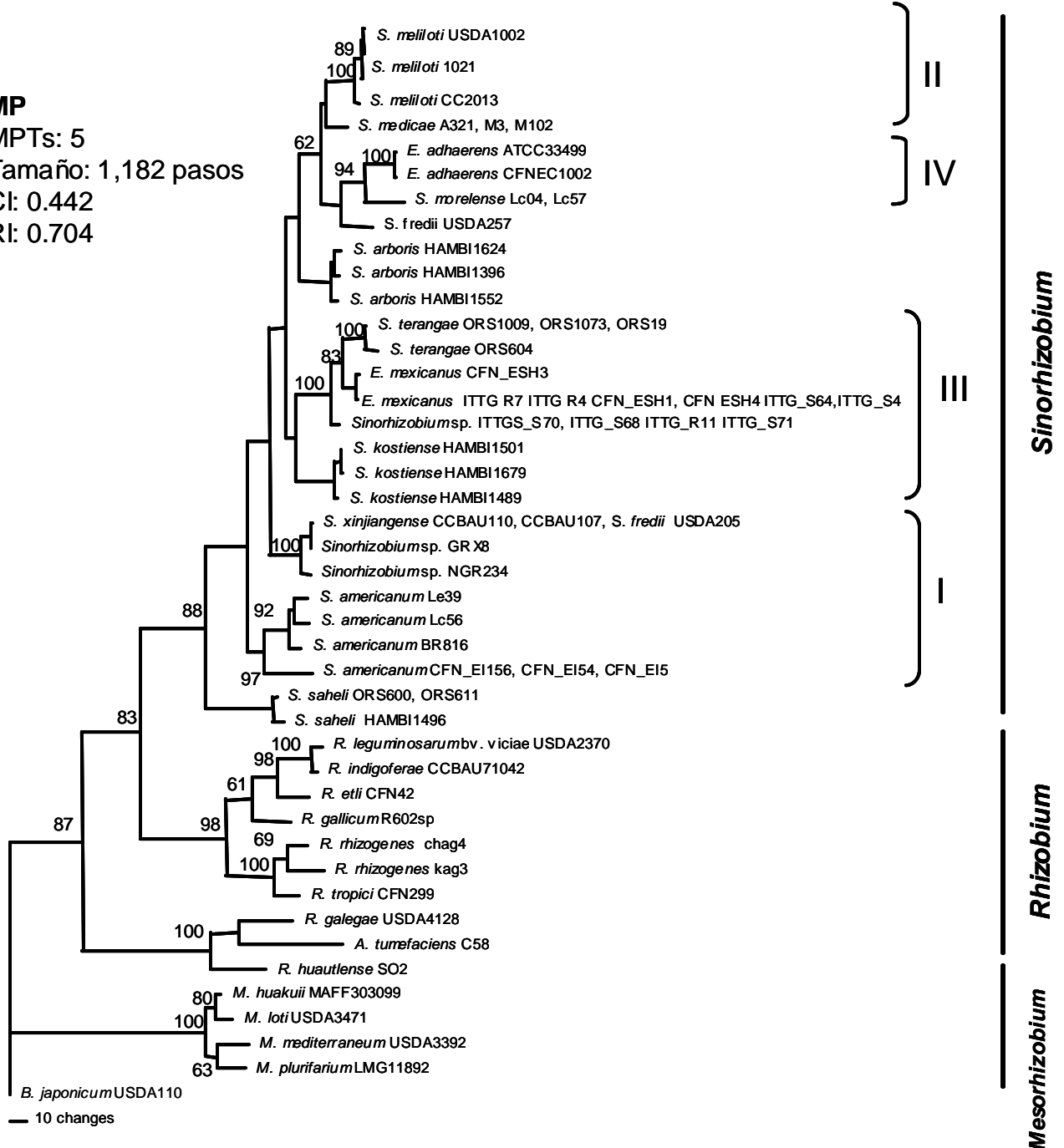


Fig. III.2.5.1D

gyrA+recA

MP

MPTs: 7

Tamaño: 2,072 pasos

CI: 0.381

RI: 0.672

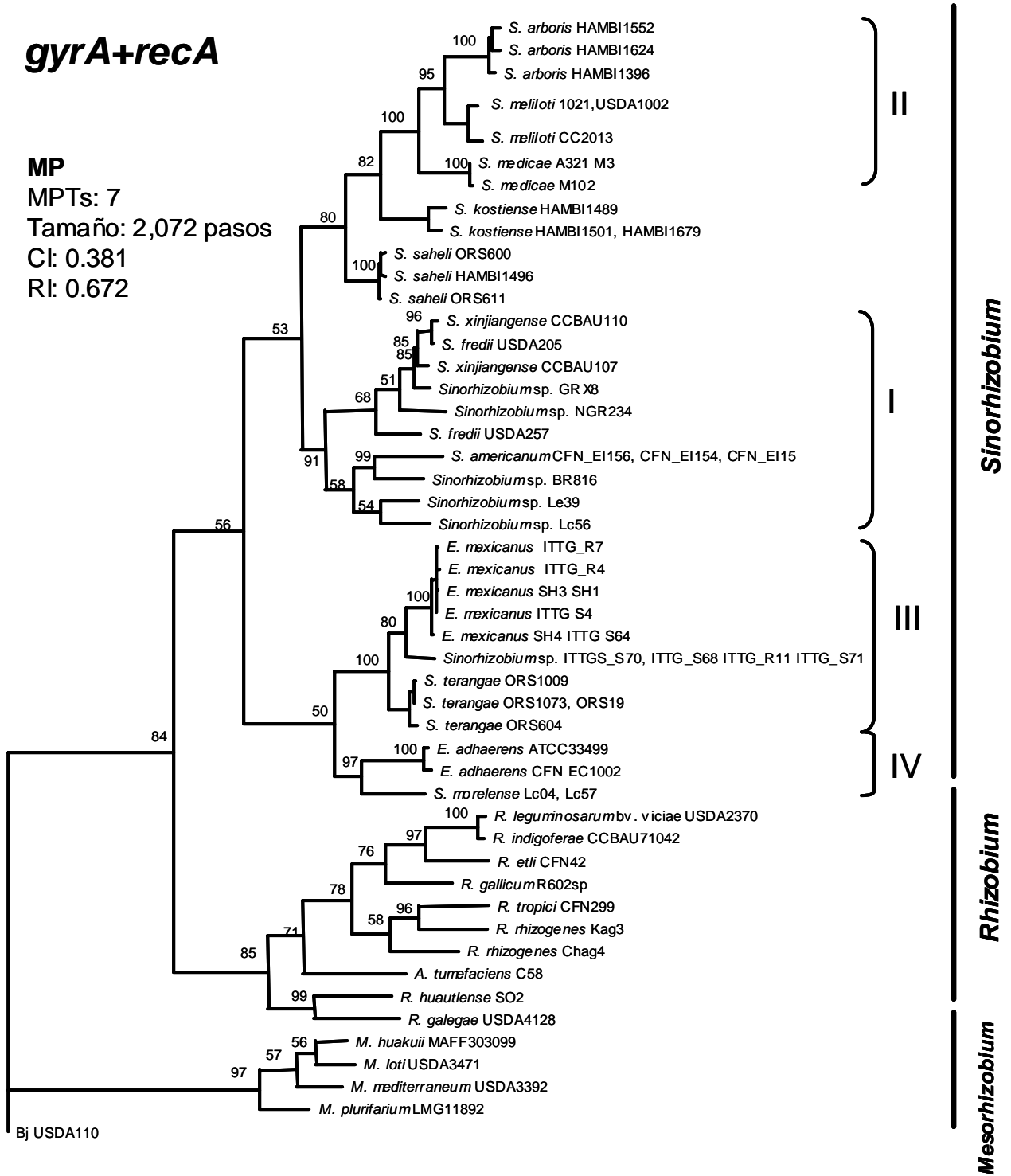


Fig. III.2.5.1E

gyrA+rpoB

MP
MPTs: 1
Tamaño: 2,419 pasos
CI: 0.412
RI: 0.701

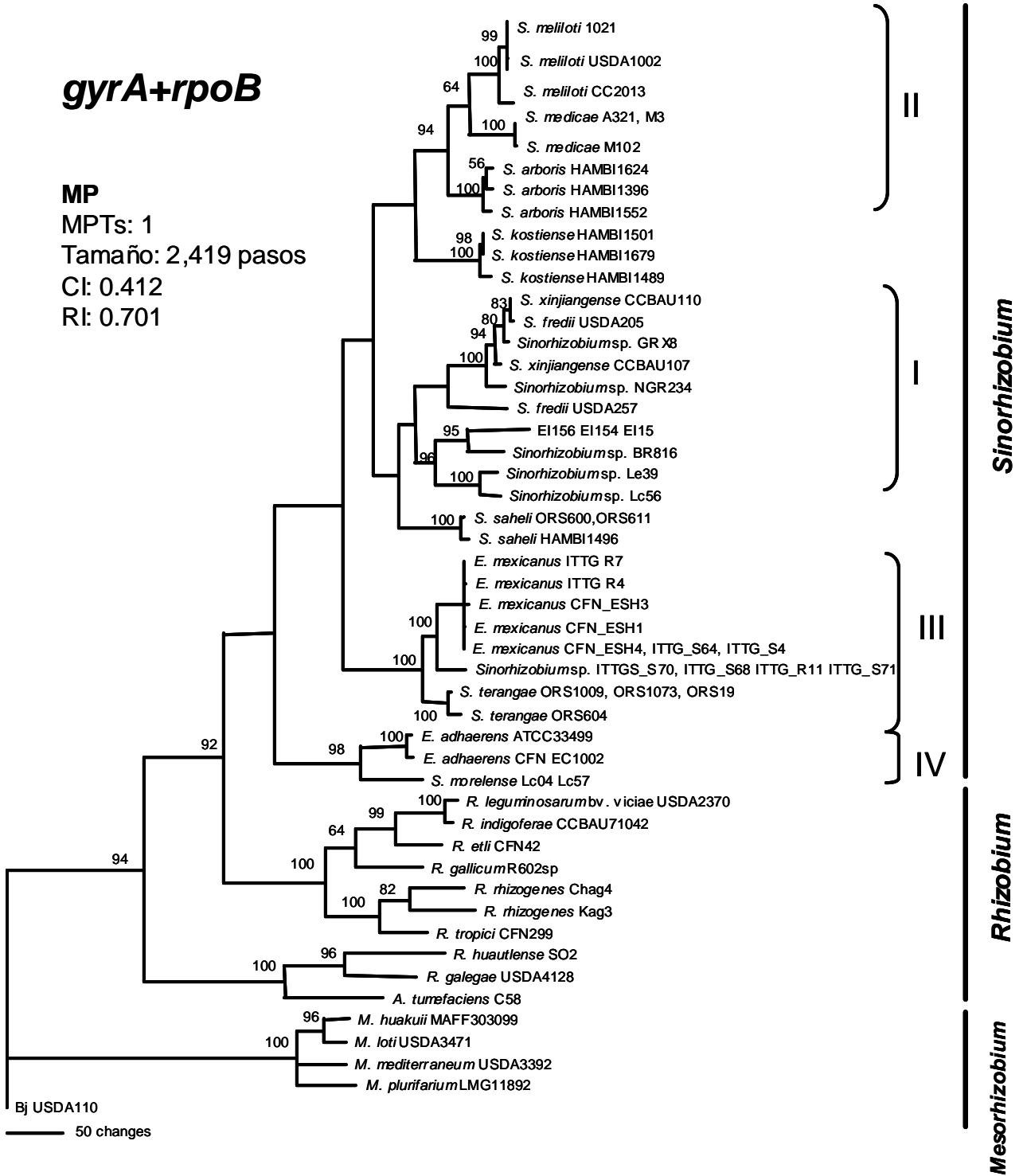


Fig. III.2.5.1F

recA+rpoB

Criterio: MP
 MPTs: 6
 Tamaño: 2,090 pasos
 CI: 0.400
 RI: 0.703

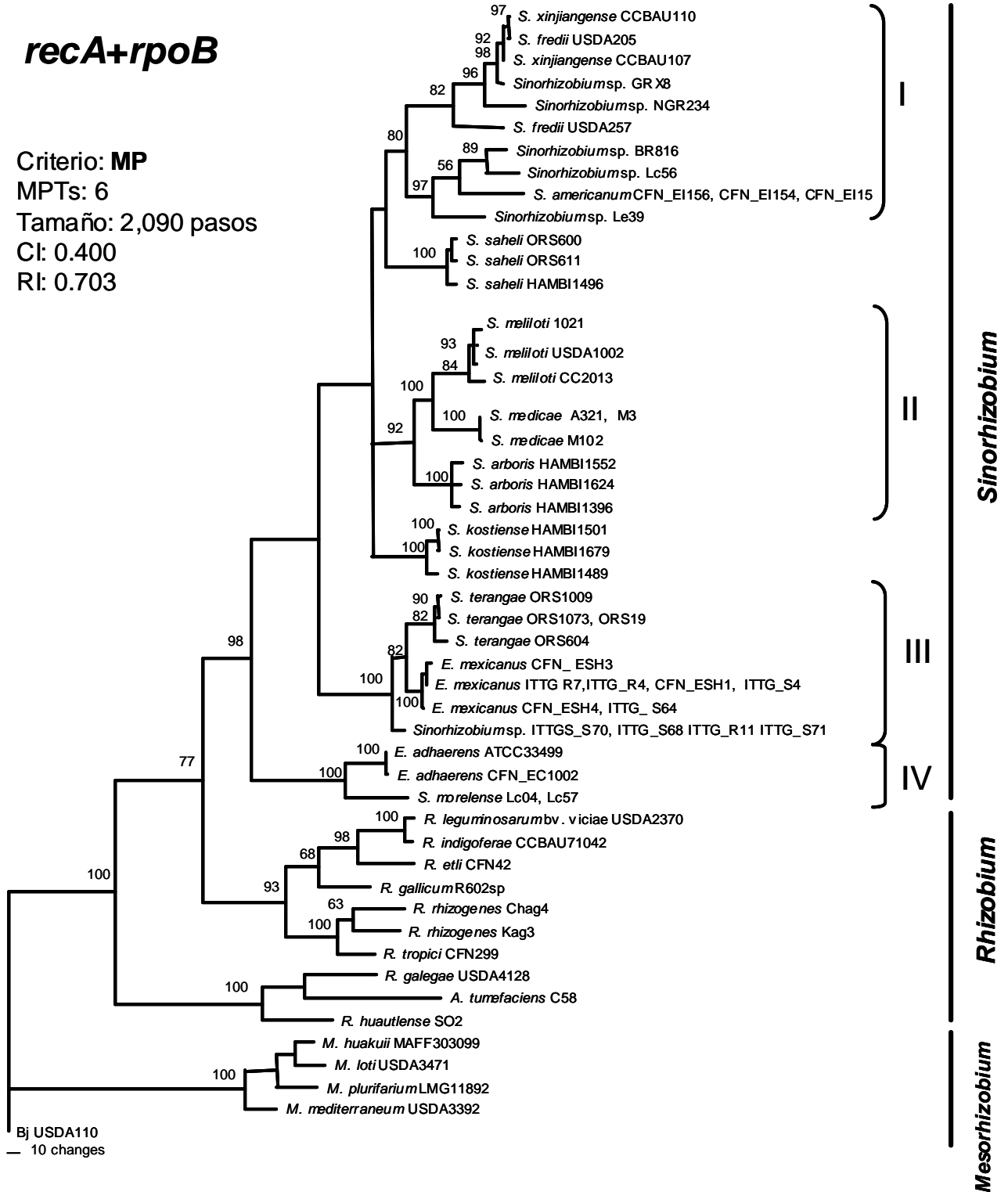


Fig. III.2.5.1G

gyrA+recA+rpoB

MP
 MPTs: 1
 Tamaño: 3,300 pasos
 Cl: 0.398
 RI: 0.708

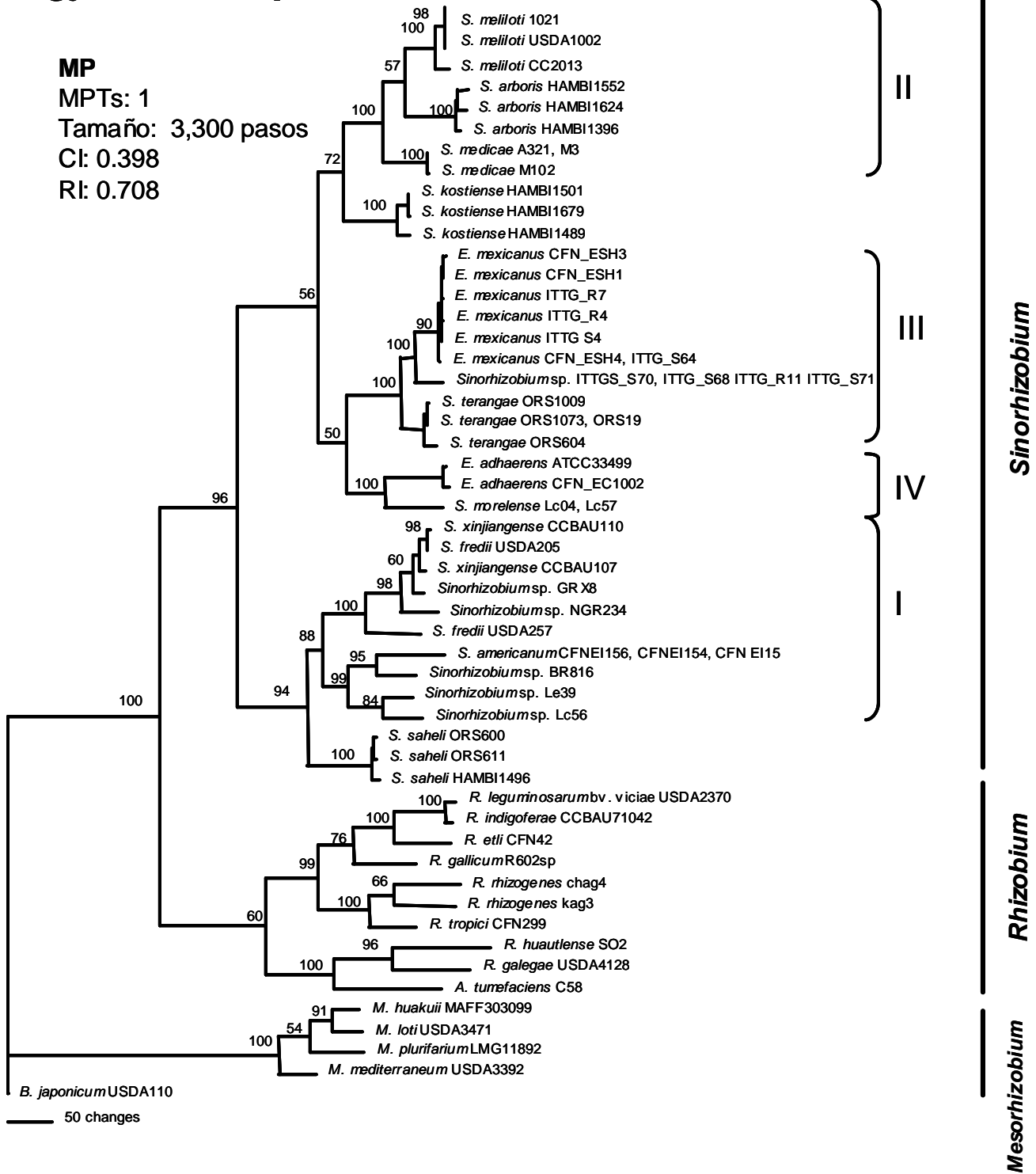


Fig. III.2.5.2B

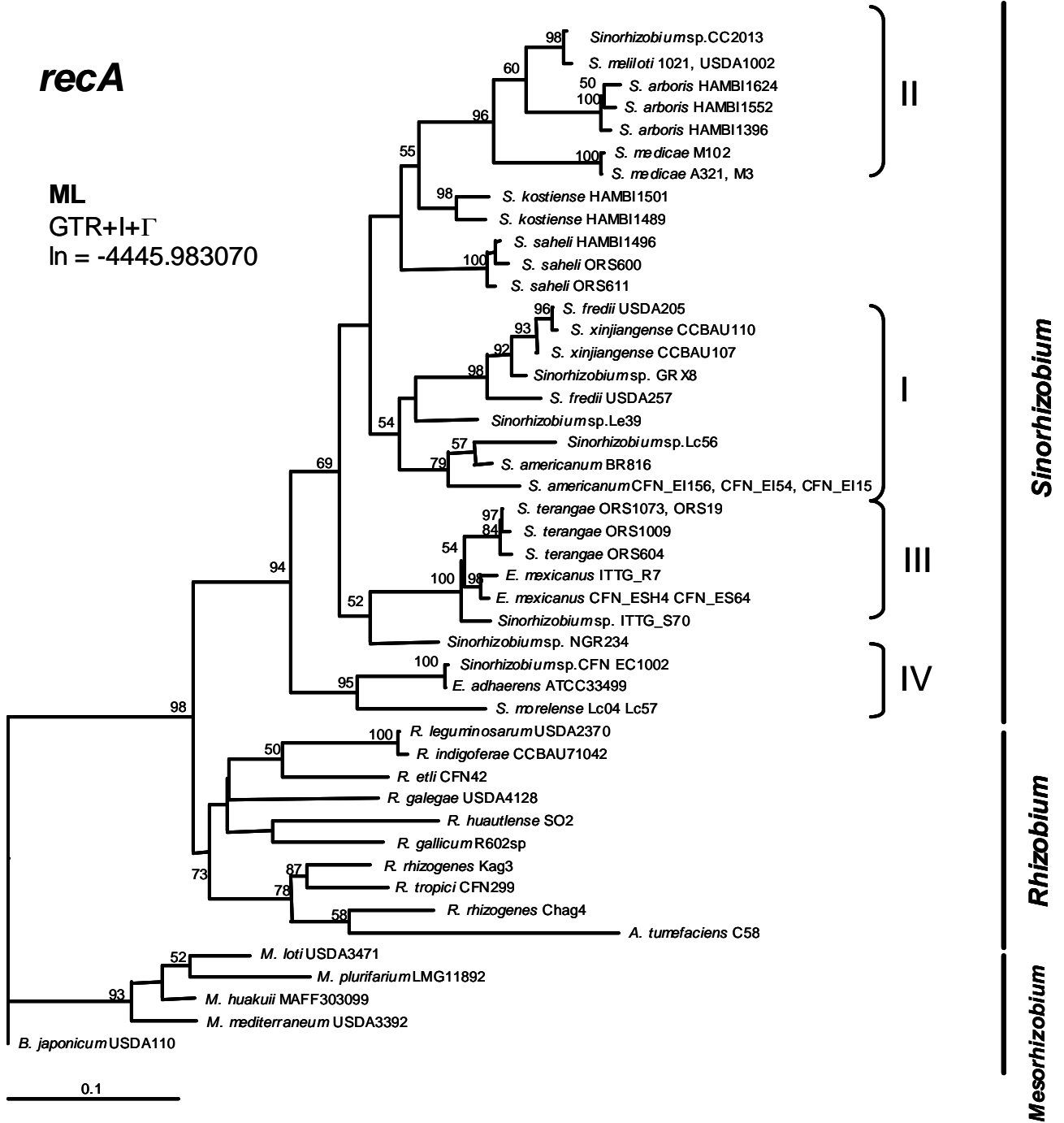


Fig. III.2.5.2C

rpoB

ML

TrN +I+Γ

ln = -6494.957164

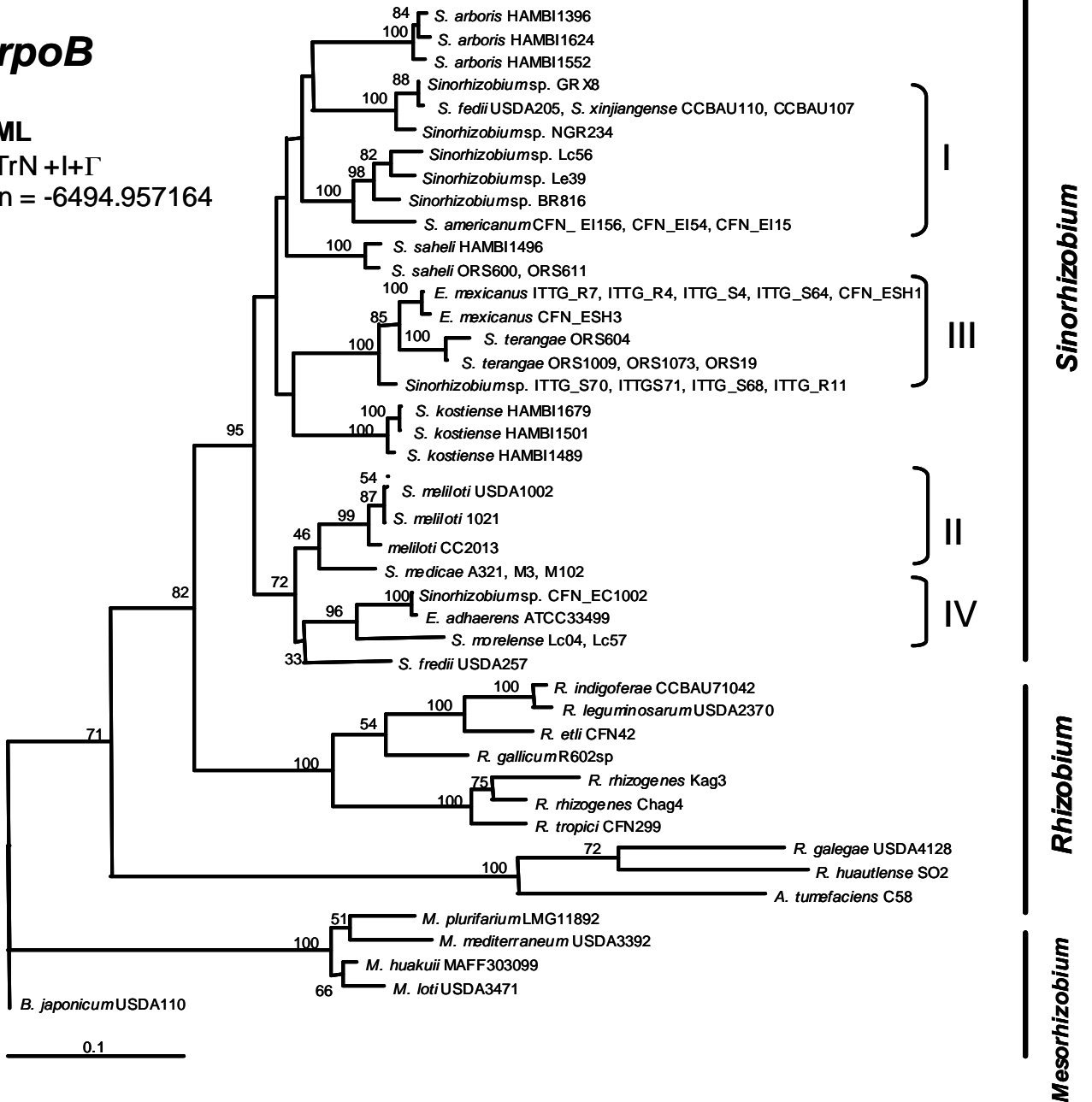


Fig. III.2.5.2D

gyrA+recA

ML
ln = -10735.509892
GTR+I+Γ

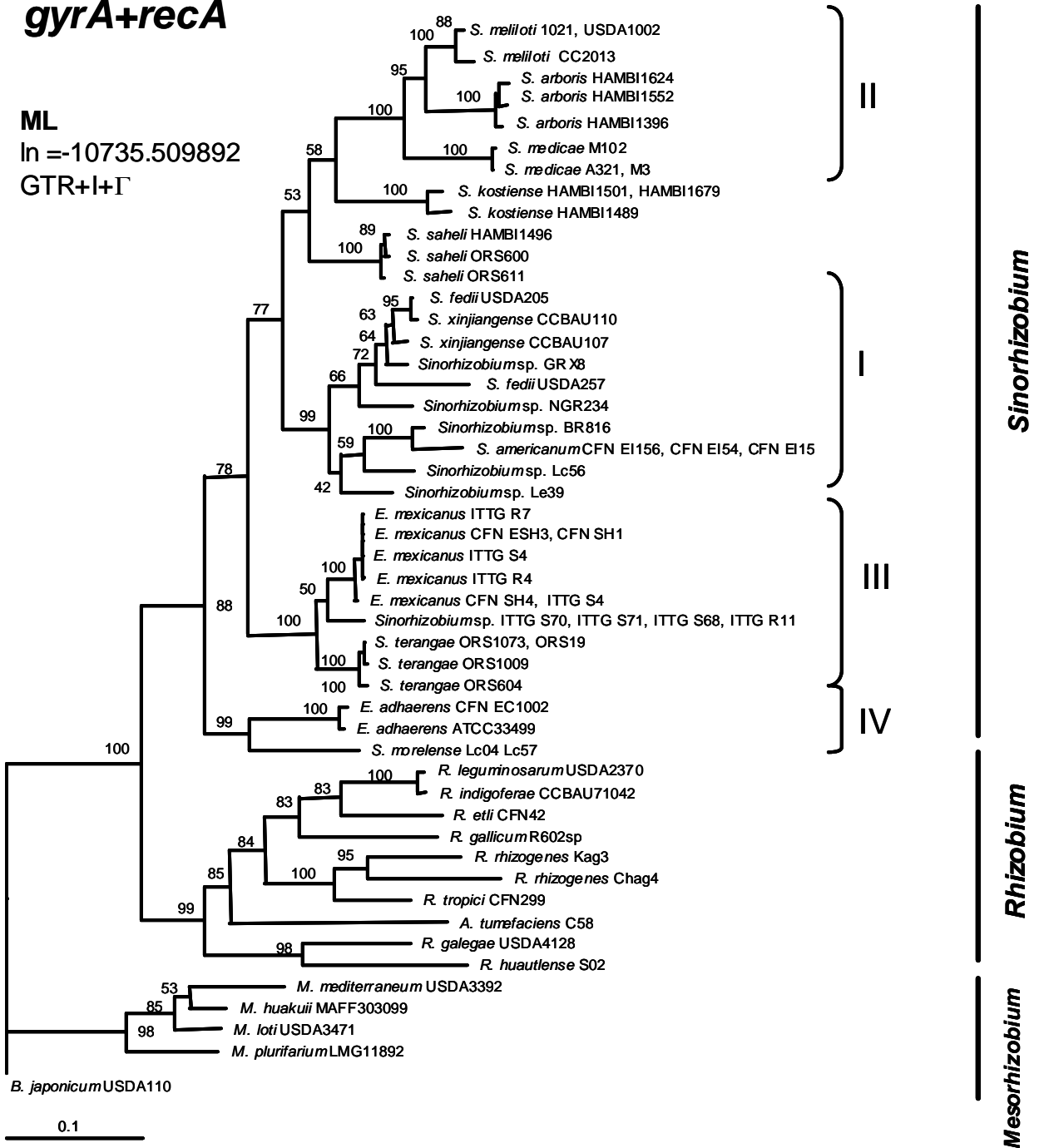


Fig. III.2.5.2F

recA+rpoB

ML
GTR+I+Γ
ln = -11249.820825

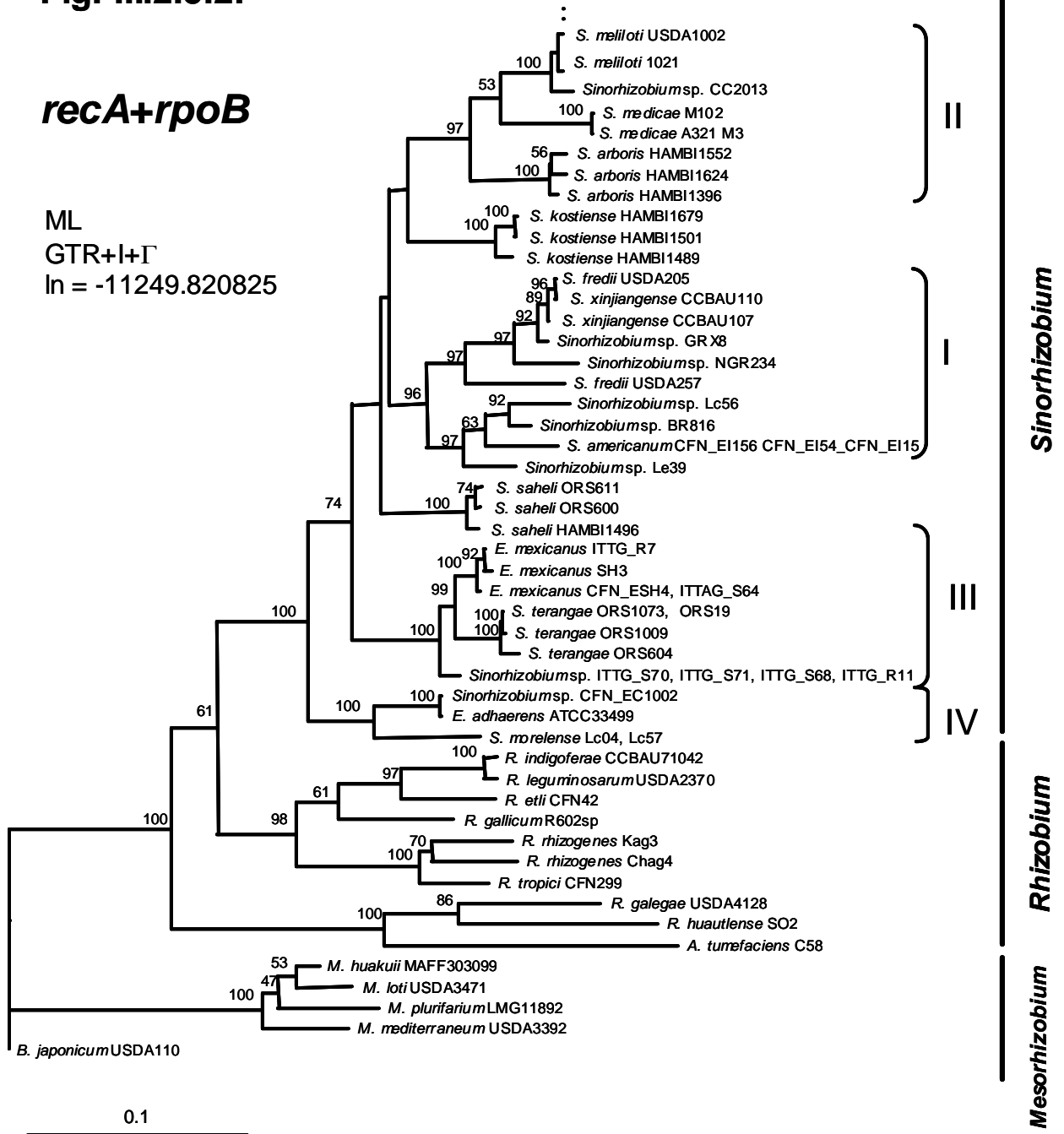


Fig. III.2.5.2G

gyrA+recA+rpoB

ML
GTR+I+Γ
ln = -17518.078995

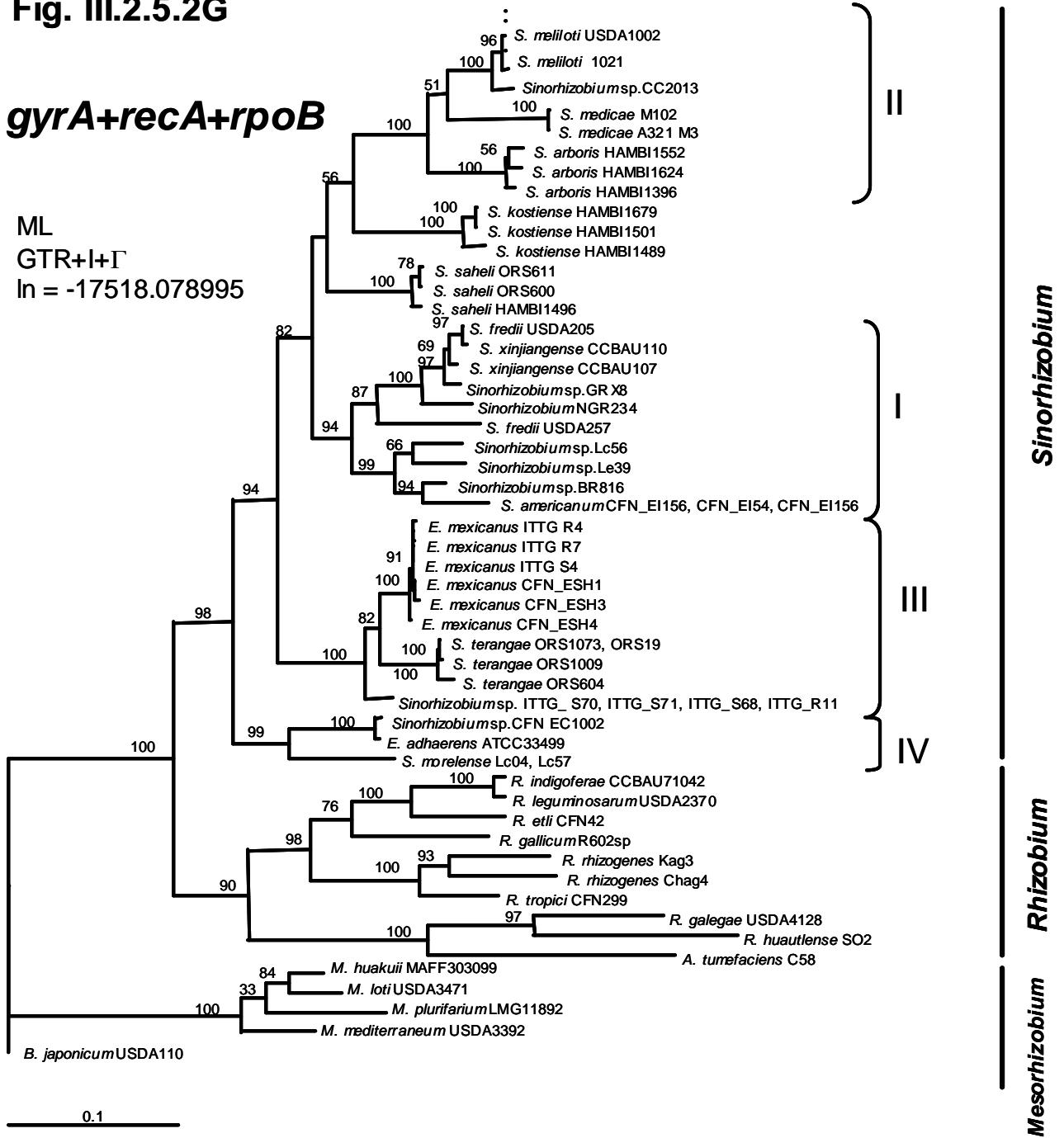


Fig. III.2.5.3 A1

gyrA

TrN+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones
 Consenso del 50%
 de mayoría con 3,751 árboles
 Burnin 25% (1,250 árboles)

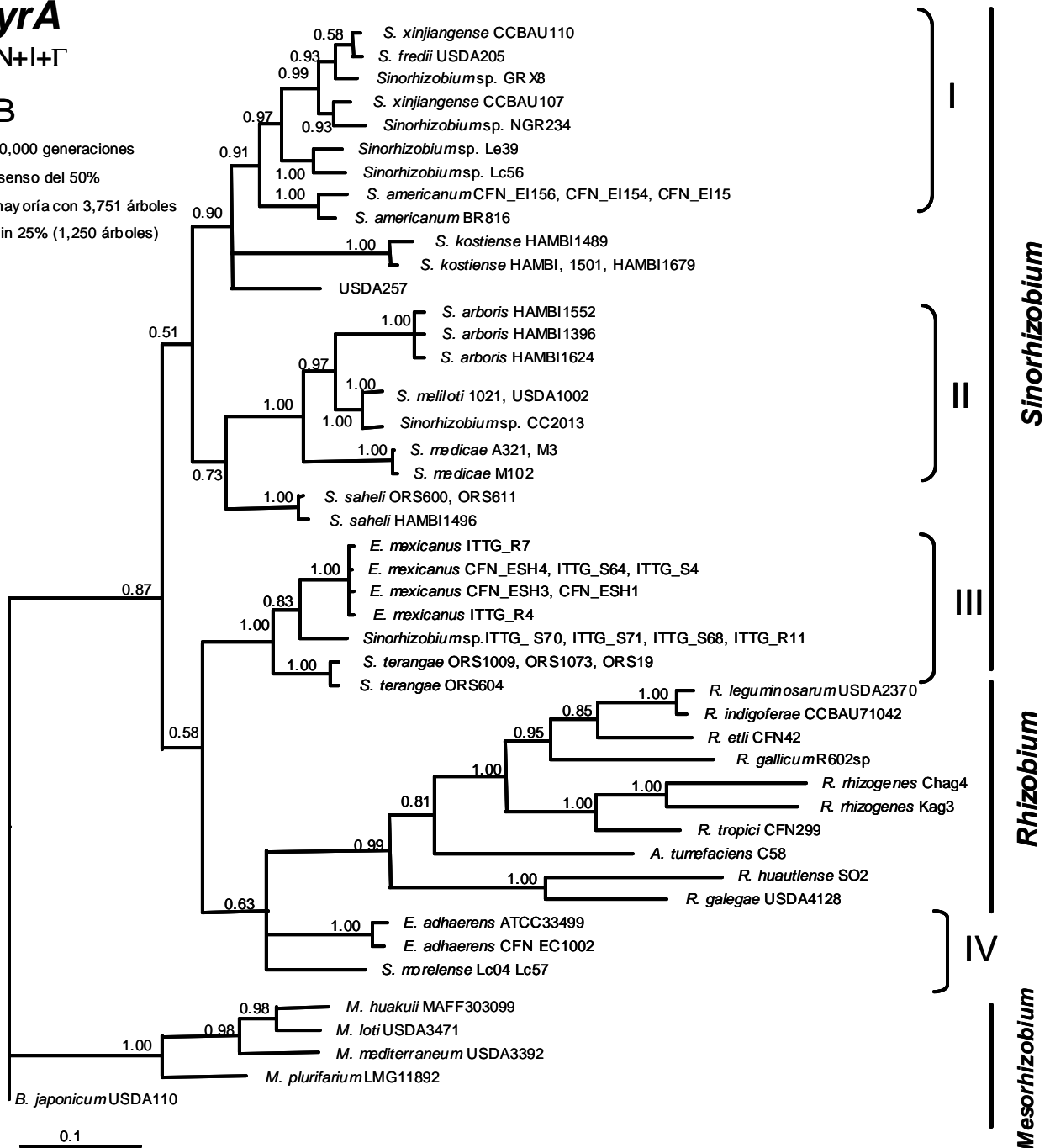


Fig. III.2.5.3 Árboles filogenéticos de las secuencias parciales de los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB* y sus posibles combinaciones bajo el criterio MB. Las posiciones del alineamiento se indican en cap. III fig 1, y las características de las secuencias se muestran en la tabla III.2.3.1 y III.2.3.2. *gyrA*, A2. *gyrA* sin incluir a *Ensifer* y *S. morelense* (*Sinorhizobium* grupo IV), B *recA*, C1. *rpoB*, C2. *rpoB* sin incluir al grupo IV D. *gyrA+recA*, E. *recA+rpoB*, F. *gyrA+rpoB*, G. *gyrA+recA+rpoB*. El grupo externo fue *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. La selección del mejor modelo se indica en el texto. Se muestran las probabilidades posteriores >0.5 como valores de soporte en los nodos.

Fig. III.2.5.3A2

gyrA

(Sin incluir a *Sinorhizobium* grupo IV)

TrN+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones
 Consenso del 50%
 de mayoría con 3,751 árboles
 Burnin 25% (1,250 árboles)

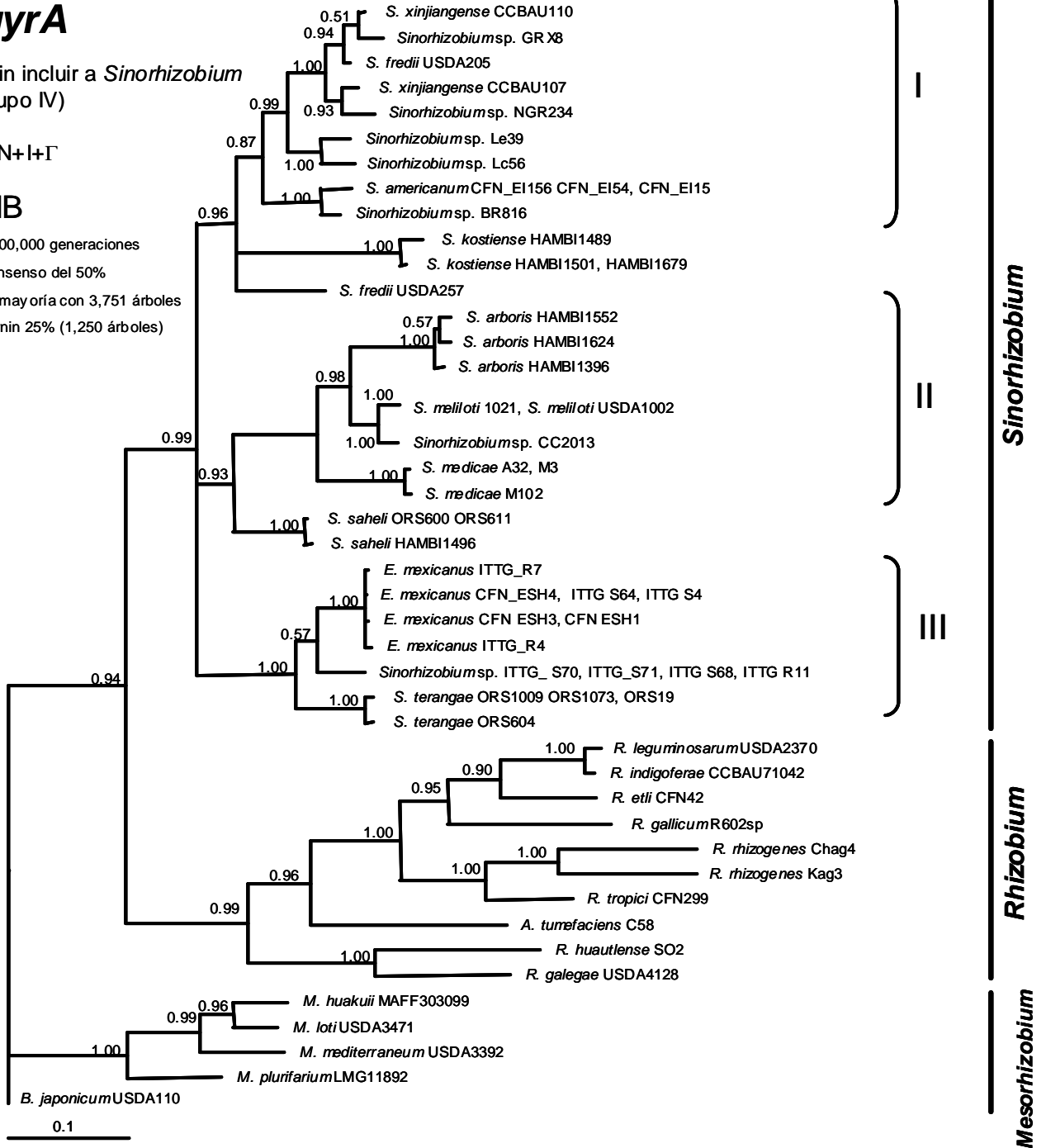


Fig. III.2.5.3B

recA

GTR+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones

Consenso del 50% de mayoría

con 3,751 árboles

Burnin 25% (1,250 árboles)

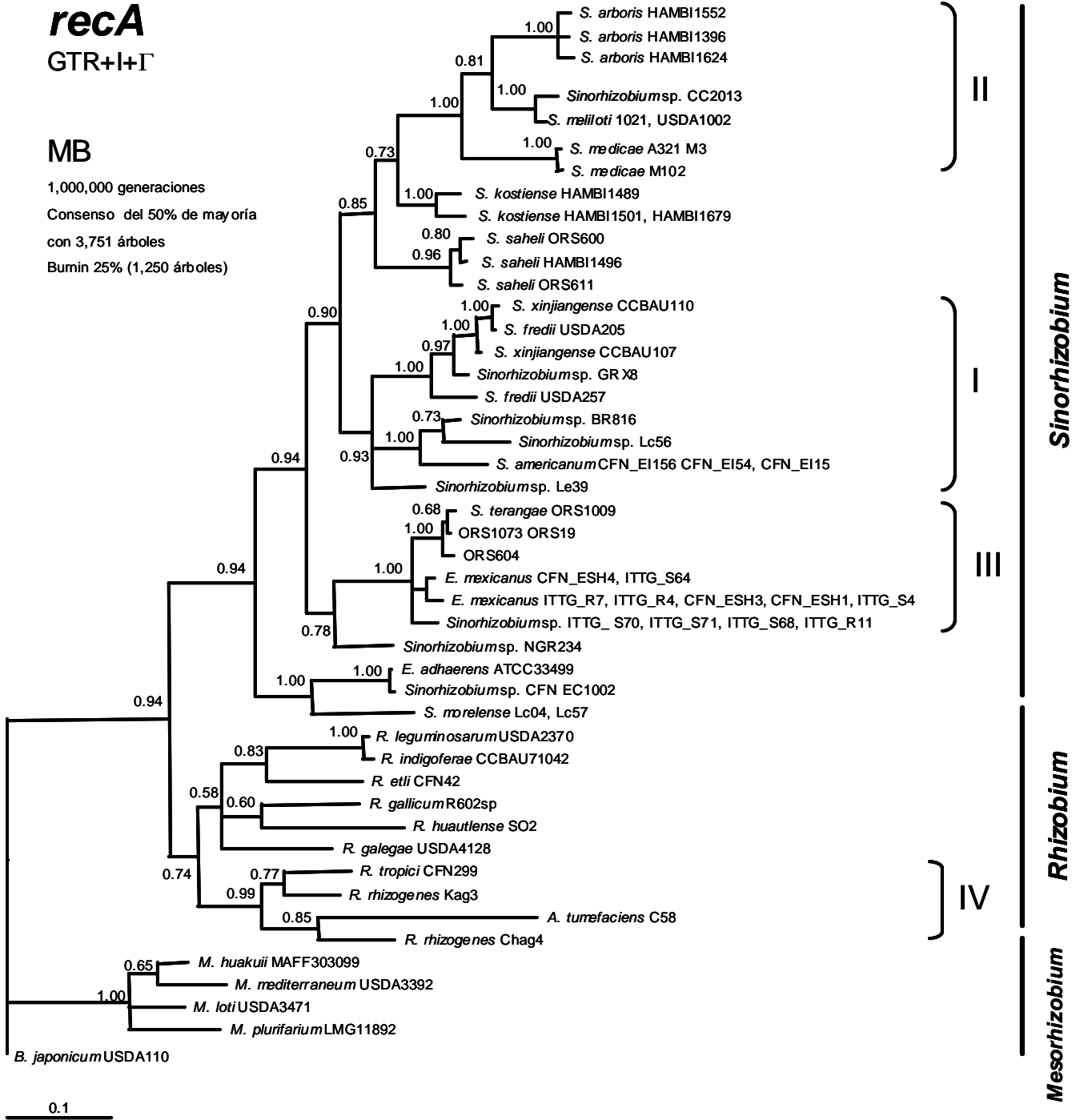


Fig. III.2.5.3C1

rpoB
TrN+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones
Consenso del 50% de mayoría
con 3,751 árboles
Burnin 25% (1,250 árboles)

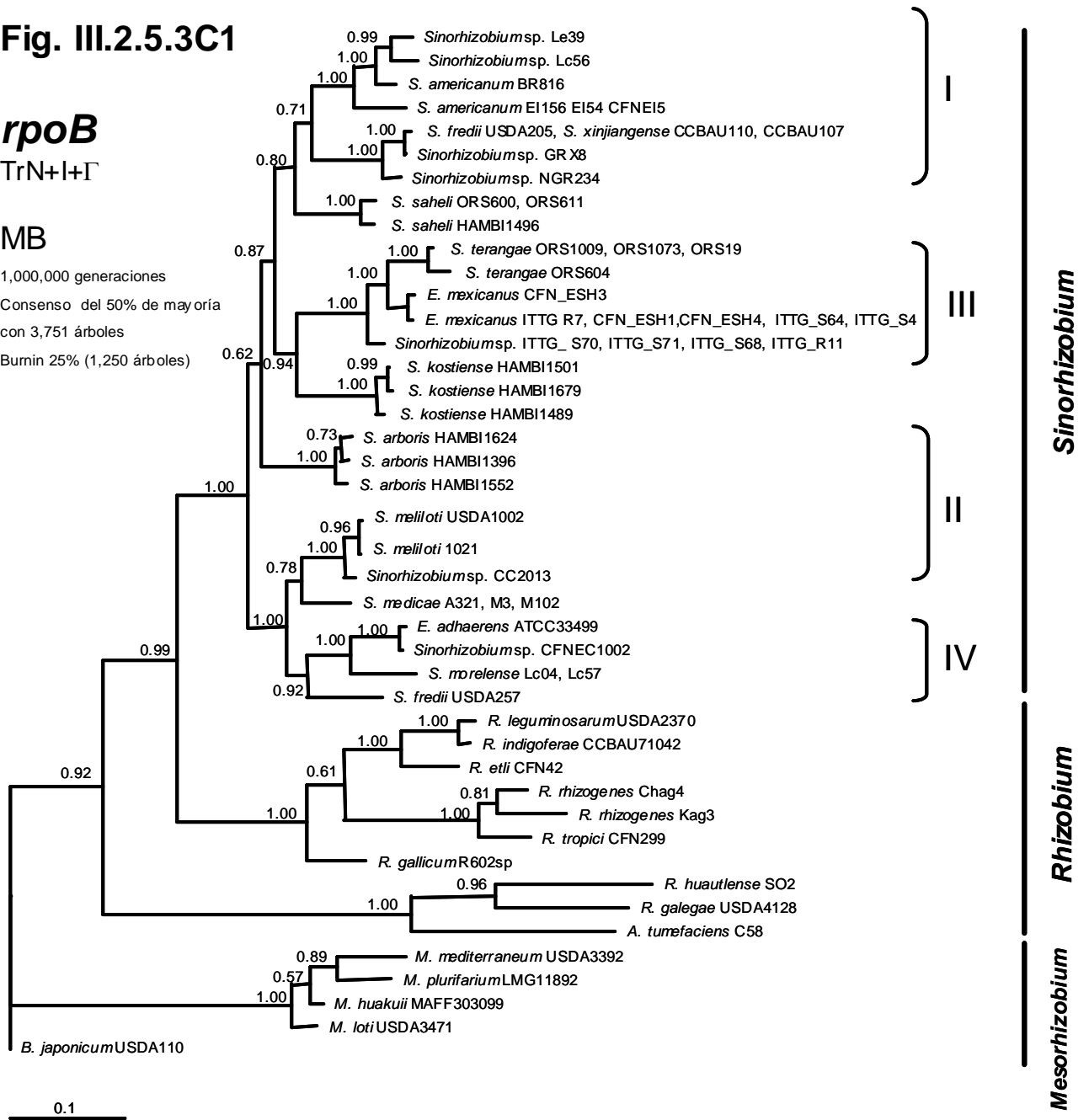


Fig. III.2.5.3C2

rpoB

Sin incluir a *Sinorhizobium* grupo IV

TrN+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones

Consenso del 50% de mayoría

con 3,751 árboles

Burnin 25% (1,250 árboles)

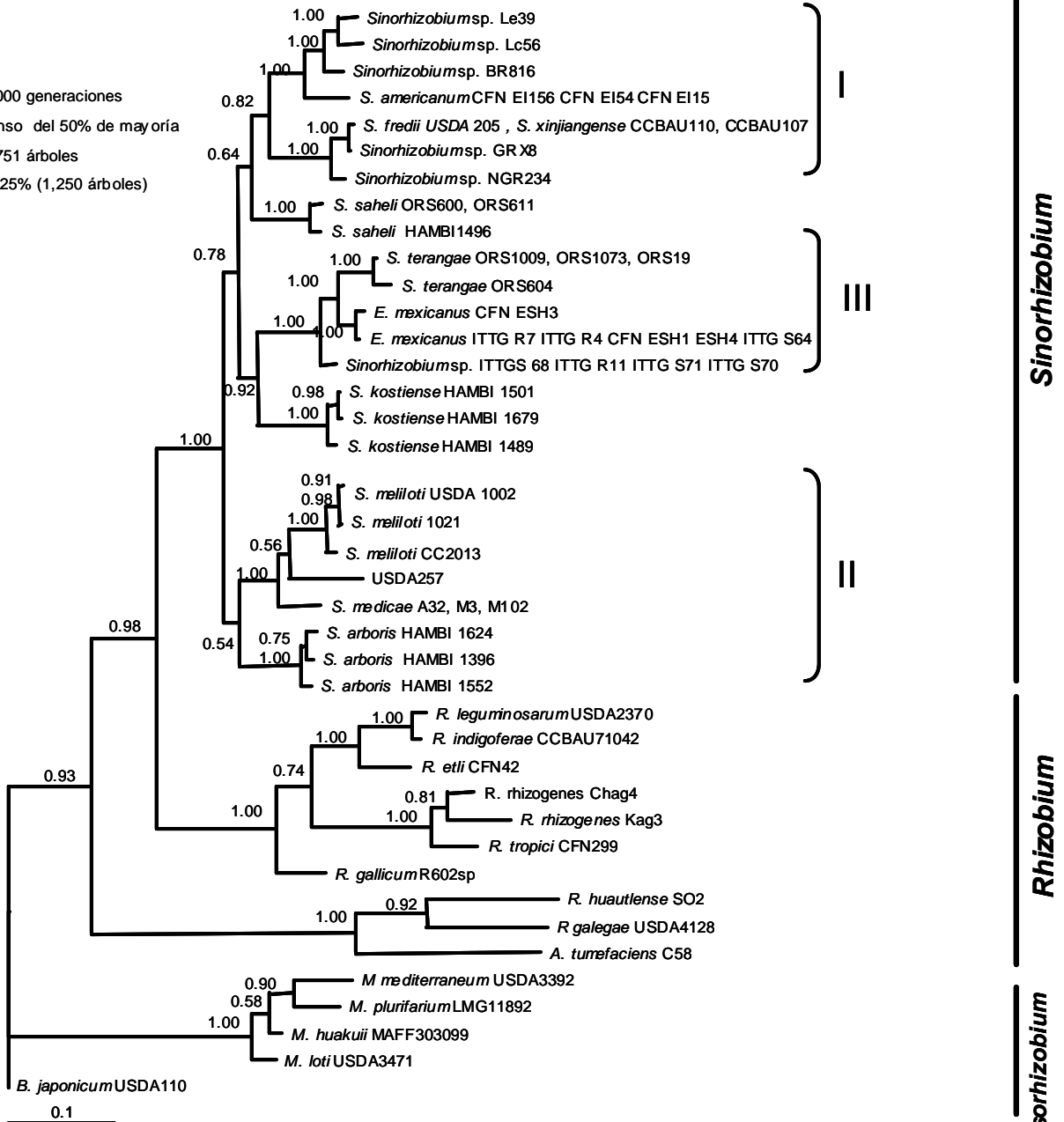


Fig. III.2.5.3D

gyrA + recA
TrN+I+Γ GTR+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones
Consenso del 50% de mayoría
con 3,751 árboles
Burnin 25% (1,250 árboles)

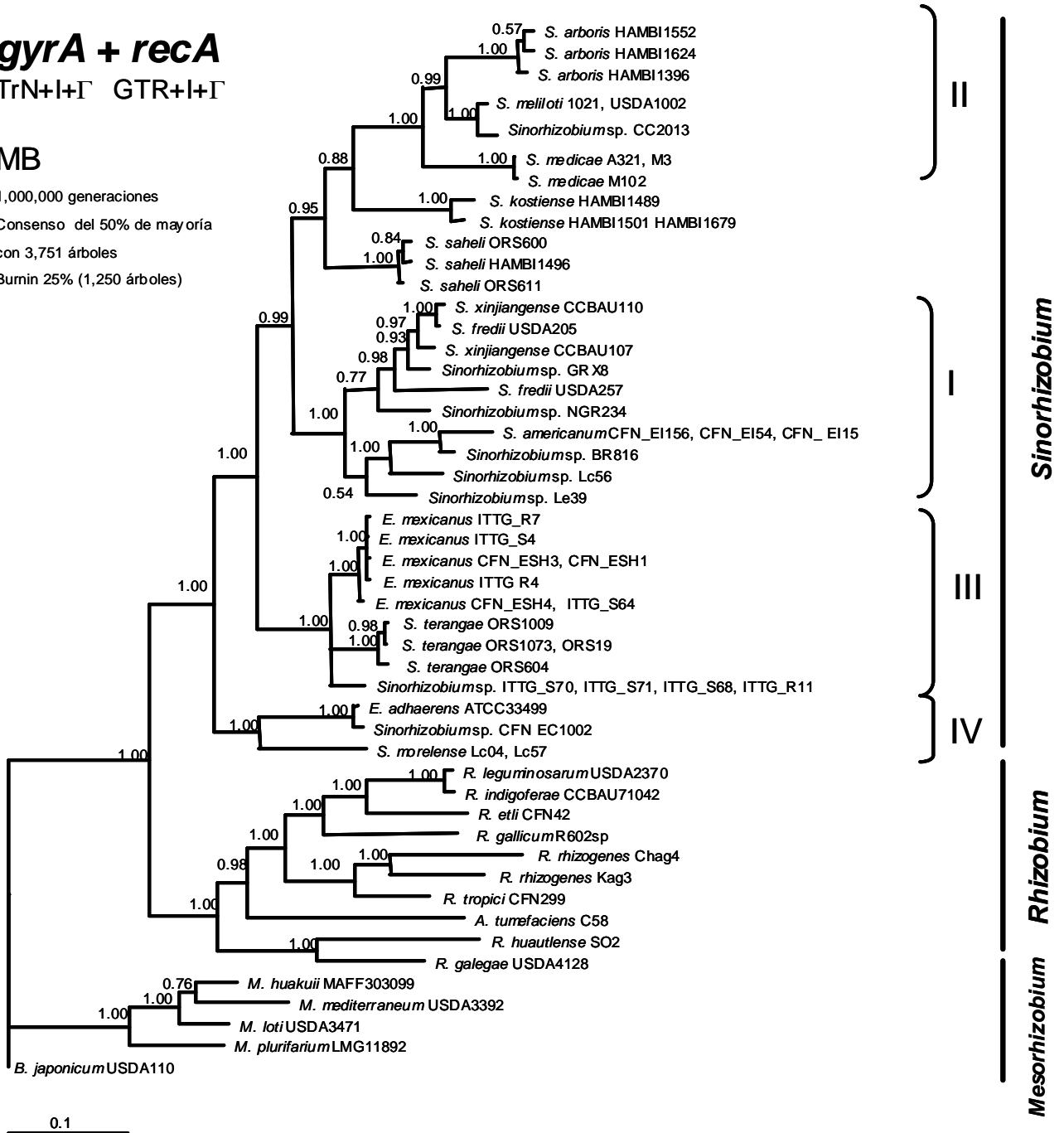


Fig. III.2.5.3E

recA + rpoB

GTR+I+Γ TrN+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones

Consenso del 50% de mayoría

con 3,751 árboles

Burnin 25% (1,250 árboles)

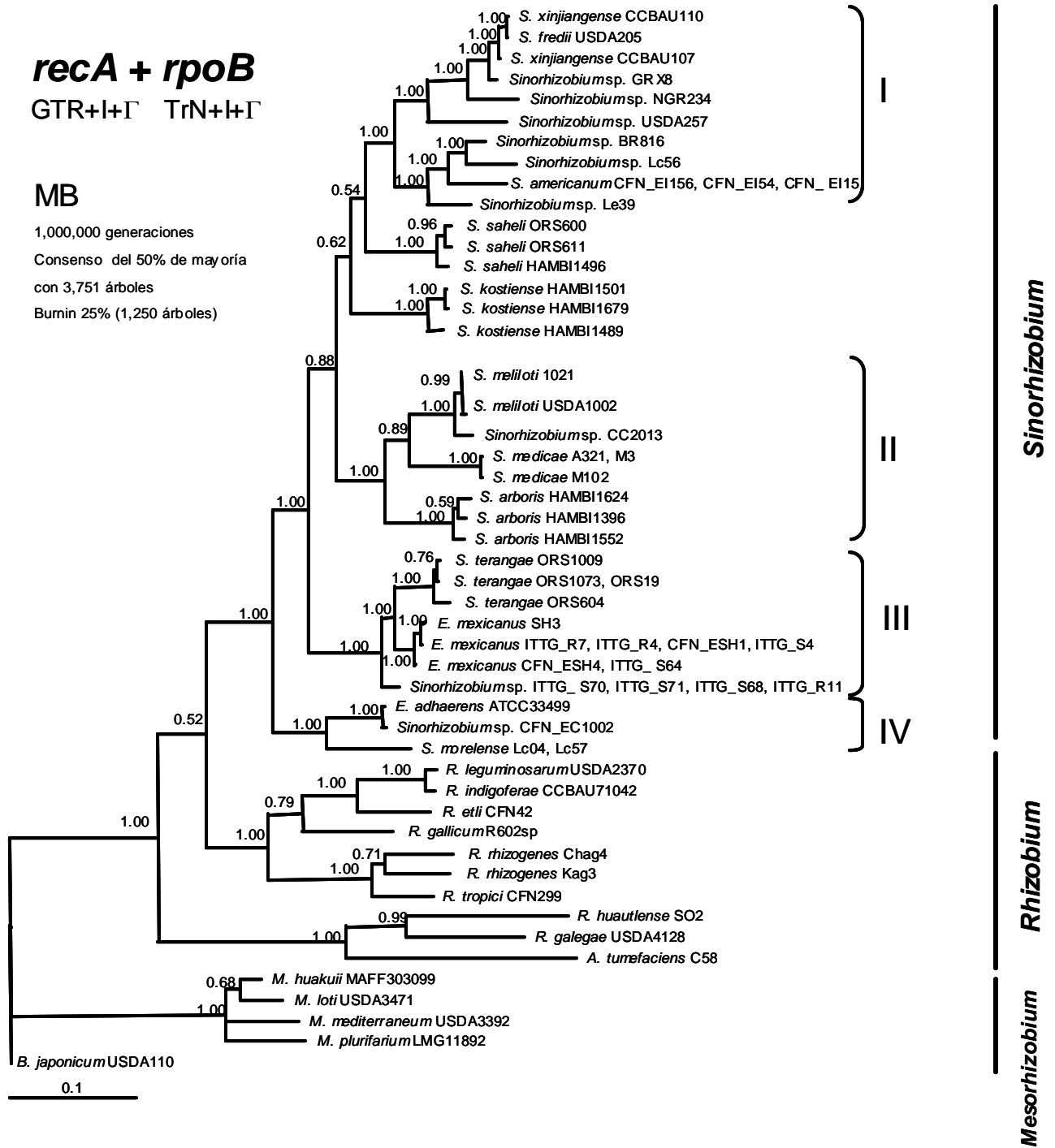


Fig. III.2.5.3F

gyrA + rpoB
TrN+I+Γ TrN+I+Γ

MB

1,000,000 generaciones
Consenso del 50% de mayoría
con 3,751 árboles
Burnin 25% (1,250 árboles)

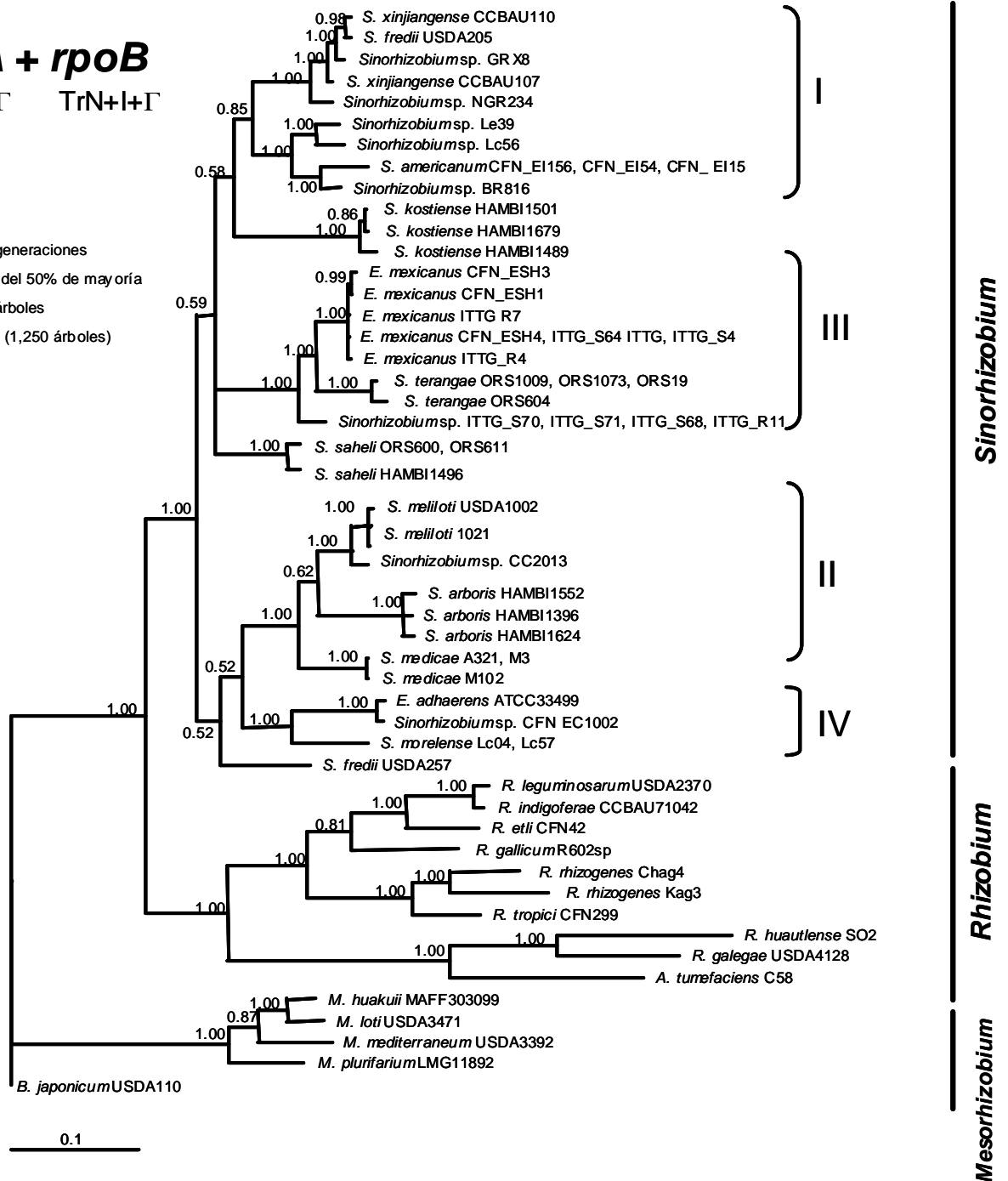


Tabla III.2.5.1 Valores de soporte de los nueve nodos que agruparon a los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*, las divisiones entre *Sinorhizobium* y *Rhizobium* y los grupos al interior de *Sinorhizobium*. máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML), inferencia Bayesiana (MB). Grupos: I = *S. fredii*-*S. xinjiangense*-*S. americanum*, II = *S. meliloti*-*S. medicae*-*S. arboris*, III = *S. terangae*-*E. mexicanus*, IV = *S. ahaerens*-*S. morelense*. Entre paréntesis se indica el valor de soporte como el porcentaje de bootstraps para los criterios MP y ML, y de probabilidades posteriores para MB. A. Filogenias con los genes individuales, B. Filogenias con los datos combinados. NG = no agrupa.

nodo	MP			ML			MB		
	<i>gyrA</i>	^m <i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	ⁿ <i>gyrA</i>	<i>recA</i>	^o <i>rpoB</i>
1. <i>Sinorhizobium</i> I	52,	57, 57	^a NG	60	54	^b <50	0.91,0.87	0.93	0.71, 0.82
2. <i>Sinorhizobium</i> II	96	93,95	^l <50	98	96	^c NG	1.00, 1.00	1.00	0.78, 0.54
3. <i>Sinorhizobium</i> III	97	98,99	100	100	100	100	1.00, 1.00	1.00	1.00, 1.00
4. <i>Sinorhizobium</i> IV	63	93,95	94	57	95	96	1.00	1.00	0.92, ----
5. <i>Sinorhizobium</i> I,II y III	^k NG	^k NG	NG	<50	69	^c NG	^f NG, 0.99	0.94	^c NG, 1.00
6. <i>Sinorhizobium</i> I, II, III y IV	55	78,94	88	52	94	95	^h NG, ----	0.94	1.00, ----
7. <i>Sinorhizobium</i> - <i>Rhizobium</i>	66	95, 94	^d 83	87	98	^d 82	IV (0.63), 94	0.94	^d 0.99,0.98
8. <i>Rhizobium</i>	68	52, <50	^e 98 y 100	93	73	^e 100 y 100	0.99, 0.99	0.74	^e 1.00 y 1.00, 1.00 y 1.00
9. <i>Mesorhizobium</i>	97	95,100	100	100	93	100	1.00, 1.00	1.00	1.00

nodo	MP				ML				MB			
	<i>gyrA-recA</i>	<i>gyrA-rpoB</i>	<i>recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA-rpoB</i>	<i>recA+gyrA</i>	<i>gyrA-rpoB</i>	<i>recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA</i>	<i>gyrA-rpoB</i>	<i>recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA-rpoB</i>
1. <i>Sinorhizobium</i> I	91	<50	80	88	97	53	96	94	1.00	0.85	1.00	1.00
2. <i>Sinorhizobium</i> II	100	94	92	100	100	97	97	100	1.00	1.00	1.00	1.00
3. <i>Sinorhizobium</i> III	100	100	100	100	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00	1.00
4. <i>Sinorhizobium</i> IV	97	98	100	100	99	99	100	99	1.00	1.00	1.00	1.00
5. <i>Sinorhizobium</i> I,II y III	^k NG	<50	<50	^k NG	86	60	74	94	1.00	ⁱ NG	1.00	1.00
6. <i>Sinorhizobium</i> I, II, III y IV	56	<50	98	96	92	99	100	98	1.00	1.00	1.00	1.00
7. <i>Sinorhizobium</i> - <i>Rhizobium</i>	84	^d 92	^d 77	100	99	98	^d 61	100	1.00	1.00	^d 0.52	1.00
8. <i>Rhizobium</i>	85	^e 100 y 100	^e 93 y 100	60	99	85	^e 98 y 100	90	1.00	1.00	^e 1.00 y 1.00	1.00
9. <i>Mesorhizobium</i>	97	100	100	100	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00	1.00

a *S. americanum* (97%) se separa de *S. fredii* - *S. xinjiangense* (100%)

b *S. arboris* se separa del grupo II y queda como grupo hermano de *S. xinjiangense* desplazando a *S. americanum*

c *S. fredii* USDA 257 se afilió al grupo IV (<50%) y este clado se agrupo con el grupo II (72%) sin incluir a *S. arboris* que se afilió dentro del grupo I

d No incluye al subgrupo *Agrobacterium*-*R. galegae*-*R. huautlense*

e El grupo de *Rhizobium*-*R. galegae*, *R. huautlense*, *Agrobacterium* se separa en dos grupos.

f I y II (0.51%) y III con *Rhizobium*-IV (0.58%)

g *S. arboris* sale del grupo II y se agrupa con I y III (0.87%)

h IV grupo con *Rhizobium* (0.63) y grupo III con *Rhizobium*-IV (0.58%)

i II agrupa con IV (0.52%) , I y III (0.59%)

k III agrupa con IV (< 50)

l El clado *S. meliloti*-*S. medicae* se agrupó con IV (62%) y *S. arboris* se aleja

m El segundo valor para *recA* bajo el criterio de MP cuando el grupo externo es *Mesorhizobium*

n El segundo valor para *gyrA* bajo el criterio de MB cuando grupo IV de *Sinorhizobium* es excluido.

o El segundo valor para *rpoB* bajo el criterio de MB cuando grupo IV de *Sinorhizobium* es excluido

Tabla III.2.5.2 Relación con el grupo más cercano de las especies o cepas con posición variable en los tres genes cromosomales bajo tres criterios de inferencia filogenética: MP máxima parsimonia, ML máxima verosimilitud, MB inferencia Bayesiana. Grupos: I *S. fredii*-*S. xinjiangense*-*S. americanum*, II = *S. meliloti*-*S. medicae*-*S. arboris*, III = *S. teranga*-*E. mexicanus*, IV = *S. ahaerens*-*S. morelense*. Entre paréntesis se indica el valor de soporte de estadístico en porcentaje de bootstraps para los criterios de máxima parsimonia y máxima verosimilitud, y de probabilidades posteriores para el criterio de inferencia Bayesiana. a. Filogenias con los genes individuales, b. Filogenias con los datos combinados. Abreviaturas: Sf = *S. fredii*, Sk = *S. kostiense*, Ss = *S. saheli*, Sx = *S. sinjiangense*, Rhiz = *Rhizobium*. A. Filogenias con los genes individuales, B. Filogenias con los datos combinados.

Tabla III.2.5.2A

Especie o cepa	MP			ML			MB		
	<i>gyrA</i>	^m <i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	ⁿ <i>gyrA</i>	<i>recA</i>	^o <i>rpoB</i>
<i>S. saheli</i>	I (52)	II-Sk (<50, <50)	I, II, III (88)	II - Sk (<50)	II - Sk (<50)	I (<50)	II (0.73)	II-Sk (0.85)	I (0.80, 0.64)
<i>S. kostiense</i>	II (<50)	II (64,63)	III (<50)	II (<50)	II (55)	III (<50)	I (0.90)	II (0.73)	III (0.94,0.92)
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	Sx (<50)	III-IV (<50, <50)	Sx-Sf (100)	I Sx-Sf (94)	III (52)	Sf-Sx (100)	Sx-Sf (0.99)	III (0.78)	I Sx-Sf (1.00, 1.00)
<i>S. fredii</i> USDA257	I (<50)	Sx-Sf (97,96)	IV (<50)	I (60)	Sx-Sf (95)	IV (<50)	I (90)	Sx-Sf (1.0)	IV (0.92), Sm-Sku(0.56)
<i>Sinorhizobium</i> grupo IV	III (<50)	III (<50, <50)	II (62)	I, II y III (52)	I, II y III (94)	II (72)	<i>Rhiz</i> (0.63)	I, II Y III (0.94)	II (1.00), ----

Tabla III.2.5.2B

Especie o cepa	MP				ML				MB			
	<i>gyrA-recA</i>	<i>gyrA-rpoB</i>	<i>recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA</i>	<i>gyrA-rpoB</i>	<i>recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA</i>	<i>gyrA-rpoB</i>	<i>recA-rpoB</i>	<i>gyrA-recA-rpoB</i>
<i>S. saheli</i>	II-Sk (80)	I (<50)	I (<50)	I (94)	II-Sk (63)	I-Sk (<50)	I y II (<50)	II-Sk (<50)	II-Sk (0.95)	I y III (0.59)	I (0.54)	I (0.57)
<i>S. kostiense</i>	II (82)	II (<50)	I-II (<50)	II (72)	II (58)	I (53)	II-Ss (<50)	II (56)	II (0.88)	I (0.58)	I-Ss (0.62)	II (0.94)
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	Sx-Sf (51)	Sx-Sf (100)	Sx-Sf (96)	Sx-Sf (98)	Sx-Sf (78)	Sx-Sf (100)	Sx. Sf (97)	Sx-Sf (100)	Sx-Sf (0.77)	Sx-Sf (1.00)	Sx-Sf (1.00)	Sx-Sf (1.00)
<i>S. fredii</i> USDA257	Sx-Sf (68)	Sx-Sf (<50)	Sx-Sf (82)	Sx-Sf (100)	Sx-Sf (72)	Sx-Sf (<50)	Sx-Sf (<97)	Sx-Sf (87)	Sx-Sf (0.98)	II-IV (0.52)	Sx-Sf (1.00)	Sx-Sf (1.00)
<i>Sinorhizobium</i> grupo IV	III (50)	I, II y III (<50)	I, II, y III (98)	III (50)	I, II,y III (92)	I, II,y III (99)	I, II,y III (100)	I, II y III (98)	I, II y III (1.00)	II (0.52)	I, II y III (1.00)	I, II y III (1.00)

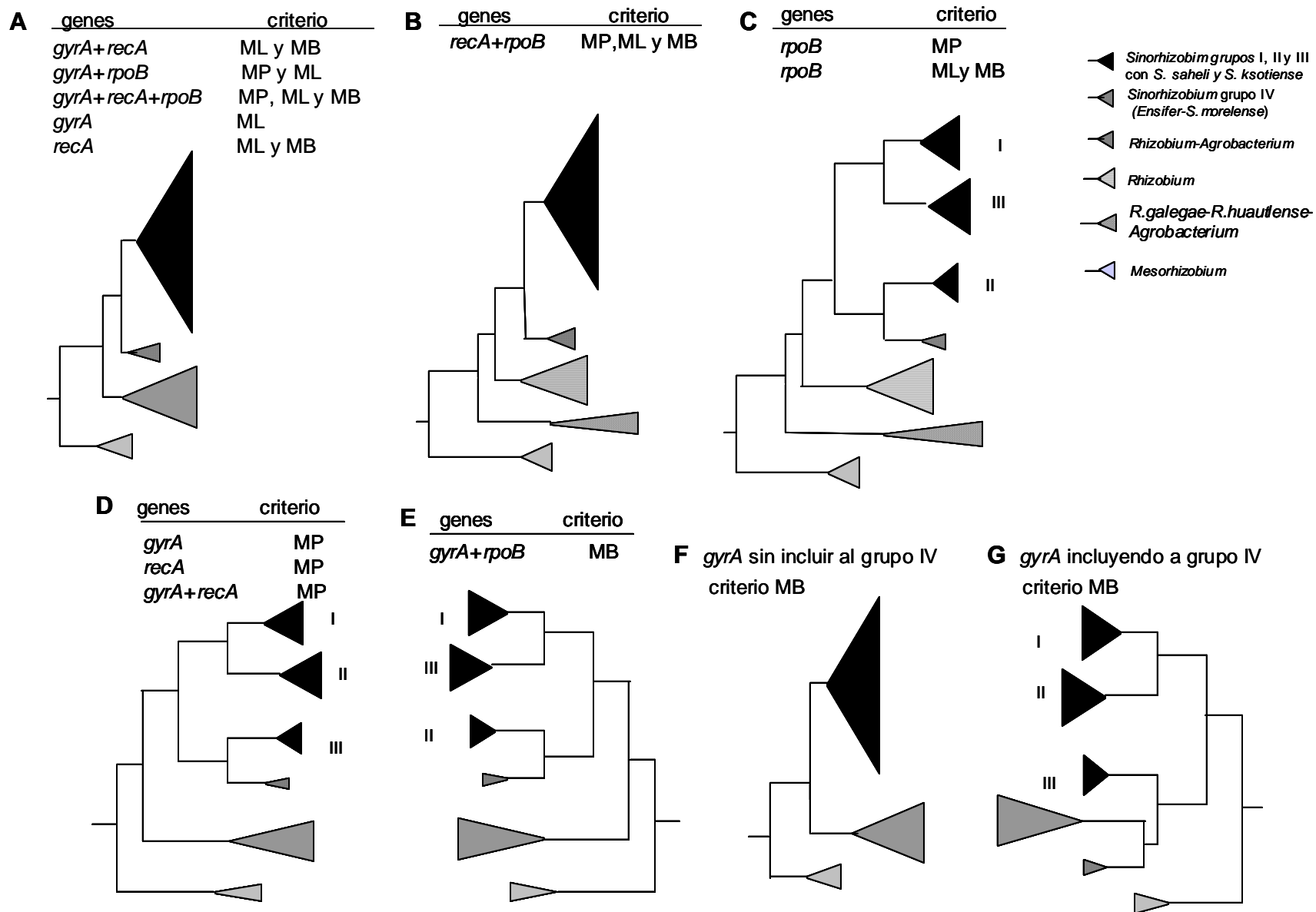


Fig. IV.2.5.4 Resumen de las topologías de las figuras IV.2.5.1-3 que muestra las relaciones entre el género *Sinorhizobium* y sus dos géneros más cercanos *Rhizobium-Agrobacterium* y *Mesorhizobium*.

Fig.III.2.5.5 Porcentaje de nodos que alcanzan el 75% de soporte de bootstrapas para los criterios de MP y ML, y probabilidad posterior de 0.75 para el criterio de MB, en las filogenias de los genes individuales *gyrA*, *recA* y *rpoB*, y sus combinaciones. Entre paréntesis se muestra el tamaño del alineamiento. A MP, B. ML, C. MB. Bajo el criterio de MB se muestran las filogenias con los genes *gyrA* y *rpoB* sin incluir al grupo IV (*Ensifer-S. morelense*). Se consideró como el 100% a los nueve grupos de la tabla IV.2.5.1, y para las filogenias con los genes *gyrA* y *rpoB* bajo el criterio de MB en donde el grupo IV fue excluido, se consideró como el 100% a los siete grupos restantes.



Porcentaje de nodos que alcanzan Una probabilidad postreior de 0.75

III. 2.6 Intervalos del 95% confianza de la similitud entre- e intra-géneros.

Con el fin de verificar si los grupos filogenéticos son coherentes, se determinó si las diferencias entre las especies de distintos géneros son estadísticamente mayores que las diferencias entre las especies de un mismo género. Se calcularon los intervalos de confianza de las identidades entre especies de un mismo género y estos intervalos se compararon con los intervalos de identidades entre dos géneros dados (fig. III.2.6, tabla III.2.6). Los intervalos correspondientes a los géneros *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* muestran una población compacta y poco variable, claramente distinguible de los demás géneros. *Ensifer*, por su parte, se distinguió con claridad de los otros grupos con *recA*. *Rhizobium* fue un grupo muy heterogéneo y no fue posible distinguirlo de *Ensifer* con *rpoB*. Con *gyrA* aunque el valor de t fue bajo, no llegó a ser menor que el valor crítico para considerarlos iguales. En este gen, también la diferencia entre *Ensifer* y *Sinorhizobium* traslapó sus intervalos de confianza, sin embargo la prueba de t fue significativa debido quizá a que el tamaño de muestra de *Ensifer* fue pequeño.

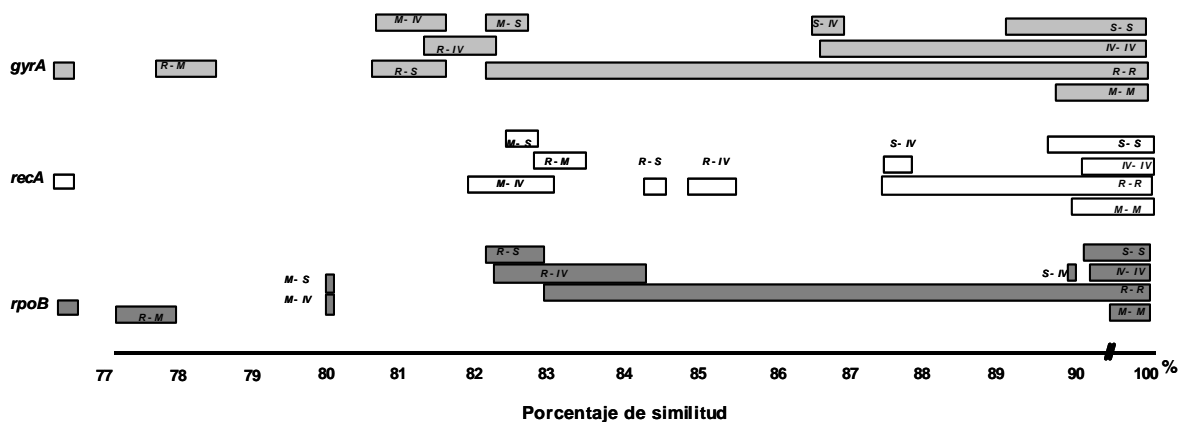


Fig. III.2.6. Intervalos del 95% confianza de la similitud intra- y entre-géneros. Los intervalos del 95% confianza fueron obtenidos a partir de una matriz de similitud construida con el alineamiento de tres genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB* en forma individual utilizando el programa BIOEDIT v.5 (Hall, 1999). Se obtuvo el valor promedio de similitud y la varianza dentro y entre los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, y las especies de *Sinorhizobium* asignadas como grupo IV (*E. adhaerens* y *S. morelense*), y se construyeron intervalos con el 95% de confianza para las similitudes. Abreviaturas: E = grupo IV (*Ensifer adhaerens* y *S. morelense*), M=*Mesorhizobium*, R = *Rhizobium*, S=*Sinorhizobium*. Las cepas y números de acceso en el Genbank de las secuencias incluidas se muestran en la tabla III.2.6

Tabla III.2.6. Similitud dentro y entre los géneros con la comparación de las secuencias de los genes *gyrA*, *recA* y *rpoB*

gen	estadística	S-S	R-R	M-M	S-R	S-M	S-E	R-E	M-E	E-E	R-M
<i>gyrA</i>	n	276	45	6	240	96	72	30	12	3	40
	x	0.895	0.834	0.914	0.809	0.825	0.865	0.819	0.812	0.924	0.781
	s	0.032	0.040	0.021	0.013	0.012	0.011	0.014	0.009	0.054	0.011
	95% confidence interval (-)	0.891	0.823	0.897	0.807	0.823	0.862	0.813	0.807	0.863	0.778
	95% confidence interval (+)	0.899	0.846	0.931	0.811	0.827	0.867	0.824	0.899	0.985	0.785
	t de Student	----	----	----	40.932	30.667	13.050	2.435	11.375	----	8.502
<i>recA</i>	n	351	91	36	378	243	135	70	45	10	126
	x	0.900	0.880	0.910	0.844	0.827	0.876	0.852	0.826	0.927	0.831
	s	0.031	0.033	0.032	0.015	0.018	0.016	0.012	0.019	0.028	0.018
	95% confidence interval (-)	0.896	0.873	0.899	0.842	0.825	0.873	0.849	0.820	0.910	0.828
	95% confidence interval (+)	0.903	0.886	0.920	0.846	0.830	0.879	0.855	0.831	0.944	0.834
	t de Student	----	----	----	30.295	36.126	10.922	7.209	6.301	----	12.603
<i>rpoB</i>	n	276	105	21	360	168	72	45	21	3	105
	x	0.918	0.844	0.949	0.826	0.805	0.901	0.832	0.803	0.956	0.776
	s	0.023	0.070	0.011	0.032	0.011	0.012	0.034	0.006	0.035	0.024
	95% confidence interval (-)	0.915	0.831	0.945	0.823	0.804	0.898	0.822	0.800	0.916	0.772
	95% confidence interval (+)	0.921	0.857	0.954	0.830	0.807	0.904	0.842	0.805	0.996	0.781
	t de Student	----	----	----	42.003	70.032	8.244	1.478	53.660	----	9.436

III.2.7 Determinación del número de operones ribosomales en *Sinorhizobium*

La determinación del número de operones ribosomales mediante la hibridación tipo Southern contra el gen *rrs* se muestran en la fig. III.2.7 y tabla III.2.7. Las bandas con una mayor intensidad fueron consideradas como un doblete. Los pesos moleculares variaron entre las cepas tipo de las distintas especies, solamente *S. fredii* y *S. xinjiangense* presentaron un patrón muy similar. En las especies de los grupos I, II y III el número de bandas fue de tres a diferencia del grupo IV que presentó cuatro y cinco para *S. morelense* y *E. adhaerens* respectivamente. En consecuencia se deduce que el número de operones ribosomales se mantiene en número de tres dentro de las especies más cercanas del género *Sinorhizobium*, grupos I, II y III y difieren del grupo IV, en uno y dos operones. Para comprobar que el mayor número de genes *rrs* en *S. morelense* y *E. adhaerens* no fuera una característica única de cepa, este ensayo fue repetido incluyendo una cepa más de cada una de estas dos especies (fig III.2.7B). Ambas cepas de *S. morelense* Lc04^T y Lc57 presentaron 4 bandas del mismo tamaño e intensidad por lo que el número de genes *rrs* y su ubicación en el genoma no presentó variación. Para el caso de *E. adhaerens*, el número de genes *rrs* se conservó en 5 en ambas cepas pero la organización en el genoma no fue idéntica ya que la quinta banda de 2.6 kpb solo estuvo presente en *E. adhaerens* ATCC33499, y en *Ensifer* sp. CFN EC1002 la banda de 5.24 kpb fue un doblete

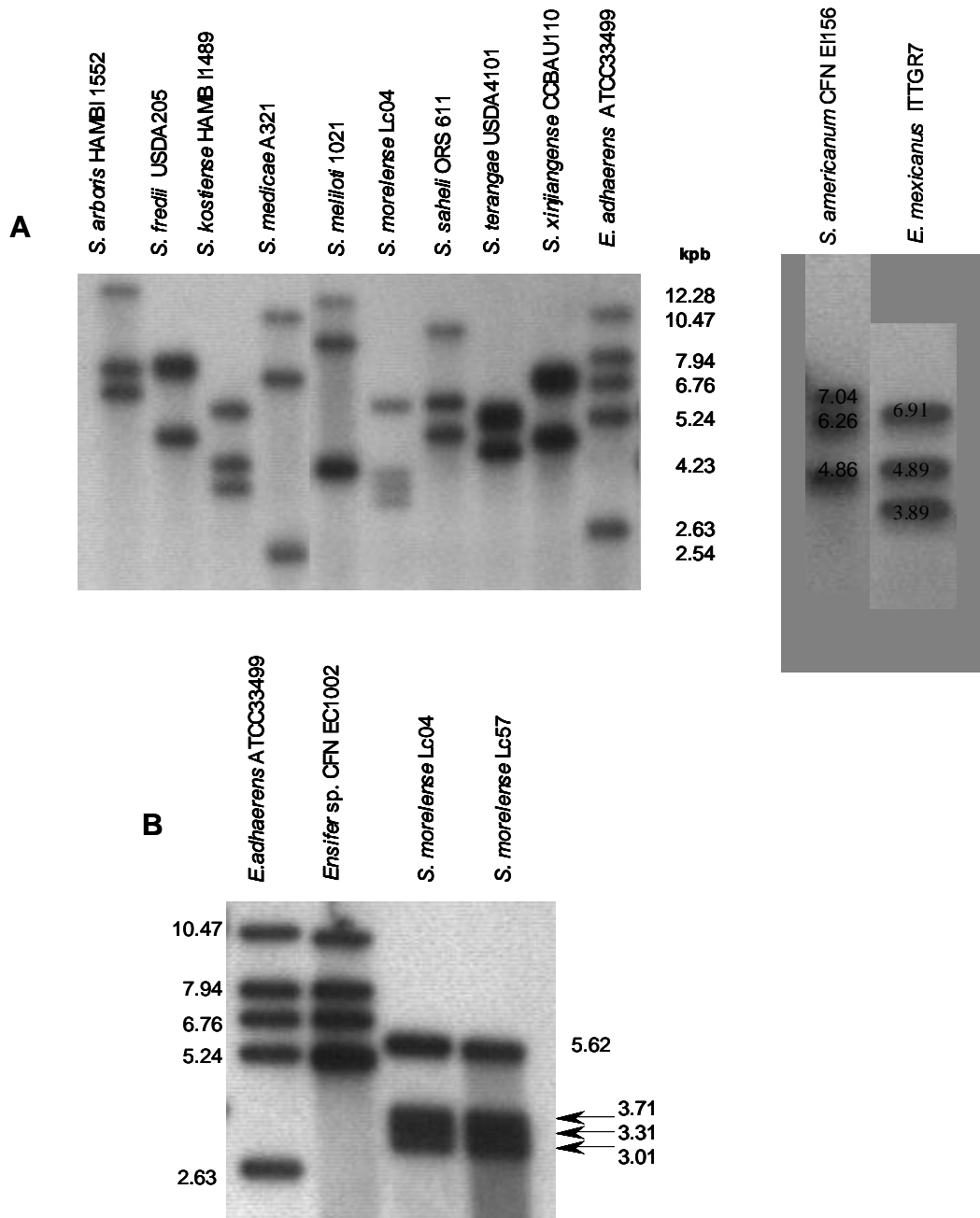


Fig. III.2.7 Determinación del número de operones ribosomales por hibridación tipo Southern contra *rrs*. Hibridación tipo Southern utilizando como sonda el producto de PCR de 1477 pb obtenido con los oligos fD1 y rD1 (Weisburg et al. 1991) marcado con ^{32}P contra DNA total de las especies descritas de *Sinorhizobium* restringido con la enzima *Hind*III. A Las especies descritas como *Sinorhizobium* y *E. adhaerens* al extremo derecho. B. Grupo IV (*Ensifer adhaerens* y *S. morelense*)

Tabla . III.2.7 Hibridación tipo Southern con DNA total de las especies del género *Sinorhizobium* y *Ensifer adhaerens* restringido con *Hind*III contra el gen *rrs* casi completo de *S. meliloti* 1021 marcado con ³²P.

cepa	<i>rrs</i>	kb
<i>S. americanum</i> CFN EI156	1	7.04
	2	6.26
	3	4.86
<i>S. arboris</i> HAMB1 1552	1	12.28
	2	7.73
	3	6.72
<i>S. fredii</i> USDA 205	1	8.09
	2	8.09
	3	5.09
<i>S. kostiense</i> HAMB1 1489	1	6.13
	2	4.64
	3	3.85
<i>S. medicae</i> A321	1	10.69
	2	7.38
	3	2.54
<i>S. meliloti</i> 1021	1	11.19
	2	8.88
	3	4.23
<i>E. mexicanus</i> ITTG R7	1	6.91
	2	4.89
	3	3.89
<i>S. morelense</i> Lc04	1	5.62
	2	3.71
	3	3.31
	4	3.01
<i>S. morelense</i> Lc57	1	5.62
	2	3.71
	3	3.31
	4	3.01
<i>S. saheli</i> ORS 611	1	9.74
	2	6.42
	3	4.23
<i>S. terangae</i> USDA4101	1	6.13
	2	5.85
	3	4.86
<i>S. xinjiangense</i> CCBAU110	1	7.04
	2	6.80
	3	4.78
<i>Ensifer adhaerens</i> ATCC33499	1	10.47
	2	7.94
	3	6.76
	4	5.24
	5	2.63
<i>Ensifer sp.</i> CFN EC1002	1	10.96
	2	7.94
	3	6.45
	(x2) 4	5.24
	(x2) 4	5.24

III.2.8 Inferencia filogenética con el gen plasmídico *nodA*

La filogenia de *nodA* (fig III.2.8) fue incongruente con la de los genes cromosomales como ya ha sido previamente reportado (Haukka et al. 1998, Chen et al. 2003). Las relaciones de las especies al interior de los géneros no se conservaron. Dentro de la diversidad de hospederos y lugares de origen de los rhizobios para los cuales se conoce la secuencia del gen *nodA*, los nuevos aislados de *Acacia angustissima* propuestos como la nueva especie *Ensifer mexicanus* (Lloret et al. 2007) y los de *Leucaena leucocephala* se agruparon en un clado bien soportado (90%) junto con *S. americanum*. Dentro de este clado, la cepa de *Sinorhizobium* sp. GRX8 fue aislada en España, sin embargo su hospedero de aislamiento fue *Phaseolus vulgaris* que también comparte simbiontes con acacias americanas (Toledo et al. 2003, Lloret et al. 2007) y pudo haber sido introducida desde Latinoamérica. Dentro del grupo de cepas americanas, se agrupó *Sinorhizobium* sp. ORS1044 aislada de *Acacia raddiana* que es una acacia natural de África y su secuencia fue casi idéntica a la del nuevo linaje mexicano aislado de *Acacia angustissima*. Esta cepa africana se separó del resto de sinorhizobia aislados en África de *Acacia*, *Prosopis* y *Leucaena* principalmente, que se agruparon en un clado muy bien soportado con el 100% de bootstraps. Dentro de este clado de cepas africanas se agrupó *S. terangae* bv. *acaciae*, que por criterio de los genes cromosomales fue el pariente más cercano de *E. mexicanus*. *S. terangae* bv. *sesbaniae* se separó del clado *Acacia-Prosopis-Leucaena* (Mimosoideae) y se agrupó con otras especies aisladas de *Sesbania* (Papilionoidea) con distinto origen geográfico (*S. saheli* bv. *sesbaniae* de Senegal, y *R. huautlense* de México). El agrupamiento de las cepas de *S. terangae* y *S. saheli* por biovariedades fue reportado previamente por Biovin y Giraud (1999). El grupo de sinorhizobia africanos tuvo como grupo hermano a un grupo de mesorhizobia aislados de acacias y leucaenas africanas muy bien soportado (100%).

Las cepas de *Sinorhizobium* sp. americanas aisladas de *Prosopis* se agruparon como un grupo hermano de los simbioses americanos aislados de *Acacia* y *Leucaena* junto con cepas de *Rhizobium* de distinta procedencia y hospedero como *R. gallicum* que fue aislada en Francia sin embargo, esta cepa fue introducida de América (Silva et al. 2005). El resto de cepas del grupo I, *S. fredii*, *S. xinjiangense* aisladas en China de *Glicine*, y *Sinorhizobium* sp. NGR234 aislada de *Lablab purpureus* en Nueva Guinea se separaron de las cepas americanas aisladas de *Acacia* y *Leucena*.

A excepción de *S. arboris* que se agrupó junto con las especies de *Sinorhizobium* aislados en África, el grupo II de *Sinorhizobium* formó un clado muy bien soportado (100%) que tuvo como cepas más cercanas a *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y *R. galegae* HAMB11207.

El resto de rizobios de α -Proteobacteria (*Bradyrhizobium* y *Methylobacterium*), así como los géneros de β -Proteobacteria, (*Burkholderia* y *Cupriavidus*), fueron los más alejados de las especies del género *Sinorhizobium*. La secuencia de *nodA* de *Azorhizobium caulinodans* no fue incluida debido a que su secuencia fue muy distante. Bajo el criterio del gen 16S rRNA esta especie se agrupa con las α -Proteobacterias, sin embargo la historia evolutiva de su simbiosis representada por la secuencia del gen *nodA* se encuentra más cerca de las β -Proteobacterias (Chen et al. 2003).

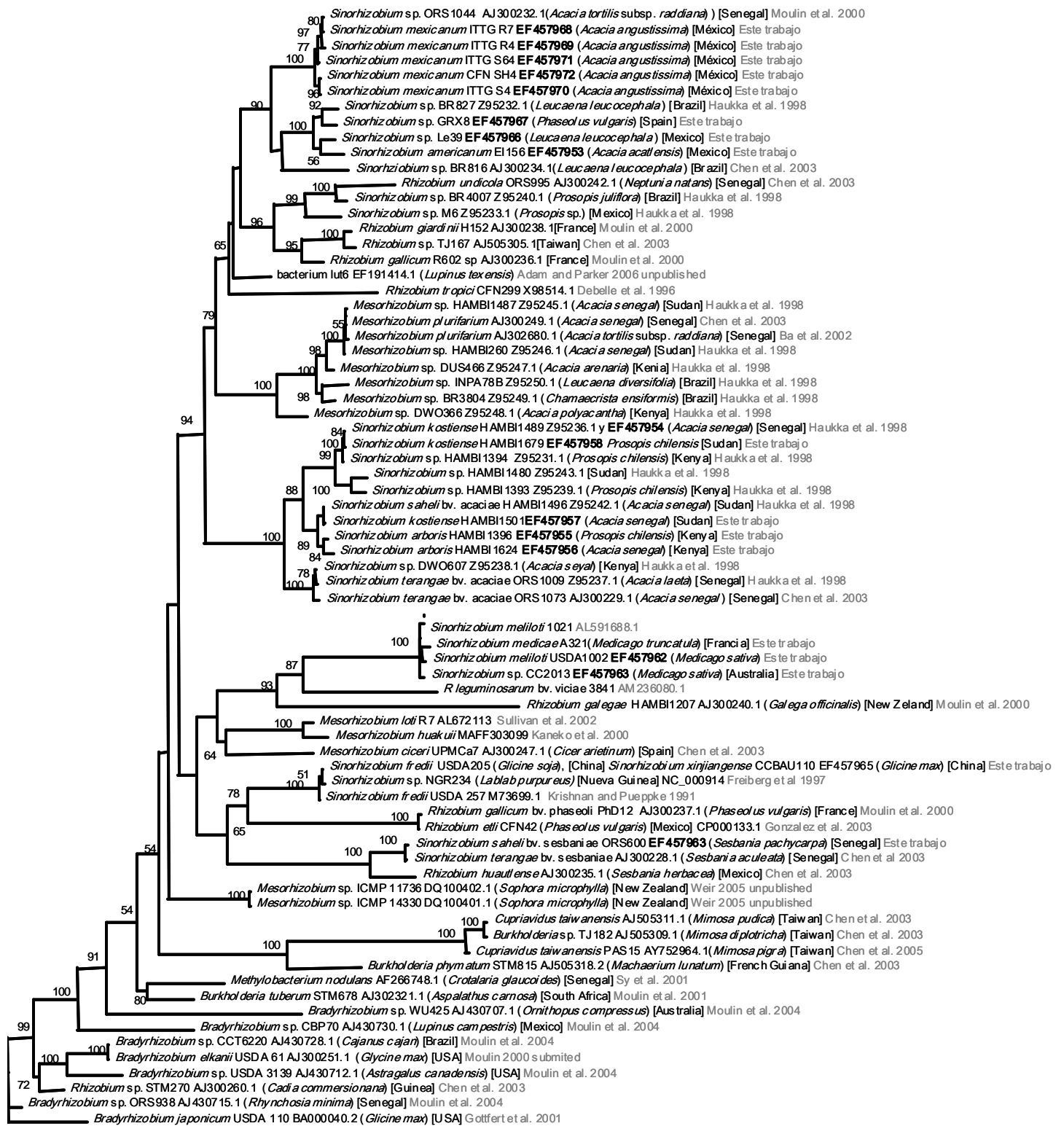


Fig. III.2.8 Árbol filogenético con las secuencias del gen *nodA* bajo el criterio de ML (ln=11778.745177) con el criterio GTR+I+Γ como el mejor modelo evolutivo obtenido con el criterio AIC. Longitud del alineamiento 498 nucleótidos, posiciones 67-564 correspondientes al gen *nodA* de *Sinorhizobium meliloti* 1021. Los valores de soporte se indican como porcentaje de bootstraps. Entre paréntesis se muestra la planta hospedera de aislamiento y entre corchetes su origen geográfico. En letra resaltada se indican los números de acceso del GenBank de las secuencias generadas en el presente trabajo.

III.3 Discusión

La comparación de la secuencia de genes ortólogos como una pequeña muestra de los genomas ha tenido un gran impacto en el establecimiento de hipótesis filogenéticas, y en procariontes ha sido especialmente útil para establecer relaciones naturales debido a que el fenotipo no suele ser útil para encontrar sinapomorfías que permitan distinguir grupos cercanos.

El regulador global involucrado en simbiosis codificado por el gen *nolR* mostró tener mayor similitud dentro de las especies del género *Sinorhizobium* que en *Rhizobium*. Esto es un indicio de que las especies de *Sinorhizobium* son un linaje más joven que *Rhizobium*. La hibridación tipo Southern contra *nolR* funcionó como un marcador taxonómico para identificar a *Sinorhizobium* y distinguirlo de *Rhizobium*, y podría ser utilizado en hibridación en colonia en estudios de biodiversidad (Toledo et al. 2003).

Los genes del core genómico comparten historias comunes (Daubin et al. 2002), por lo que la inferencia filogenética basada en la comparación de la secuencia de genes cromosomales con funciones conservadas permite acercarse a la topología que muestra relaciones entre los taxa (Woese 2002). En el presente estudio se evaluó la monofilia del género *Sinorhizobium* con las filogenias individuales y combinadas de tres genes cromosomales de función informativa, *gyrA*, *recA* y *rpoB*.

Aunque la congruencia de la inferencia filogenética debe de ser verificada de diferentes partes para conocer la contribución de cada una (Miyamoto y Fitch 1995, Swofford 1991),

no se puede esperar que las topologías de análisis filogenéticos de distintos genes sean iguales debido a que difícilmente pudieron haber preservado el mismo cambio en el tiempo. La combinación de datos representan muestras independientes dentro de los genomas, que si bien “no son la filogenia de la especie” (Maddisson 1997, Nichols 2001), pueden considerarse como un resumen de sus historias (Philippe et al. 2005). Debido a esto, en el presente estudio se consideró tanto la contribución de líneas independientes, como la evidencia total que representan sus combinaciones.

La inferencia filogenética combinando la secuencia de genes individuales ha generado controversia, ya que existen dos estrategias para resolver el conflicto entre las particiones (Philippe et al. 2005). Una de ellas considera que las clasificaciones deben de estar basadas en la evidencia total (Kluge 1989) y por lo tanto todos los datos deben de ser incluidos en un análisis combinado aun cuando las particiones estén en conflicto (Baker y Desalle 1997). La visión opuesta es la combinación condicionada a la homogeneidad y congruencia de las particiones (Bull et al 1993, de Quiroz et al 1995, Miyamoto y Fitch 1995). En este trabajo, a pesar de que el mejor modelo estimado con η LRT (Huelsenbeck y Rannala 1997) para *gyrA*, *recA* y *rpoB* fue el mismo (GTR+I+ Γ), la congruencia de sus filogenias fue rechazada bajo el criterio de MP por la prueba ILD que considera la diferencia en la longitud de los árboles real y de los que resultan del remuestreo de caracteres. La congruencia fue aceptada por la prueba de Rodrigo que sólo considera un índice de similitud de la presencia o ausencia de clados.

El aumento del número de genes incrementa los valores de soporte de las relaciones filogenéticas debido a que aumenta el número de sitios a comparar (Rokas y Carroll 2005). Un mínimo de tres genes concatenados de un total de 106 seleccionados de los genomas de ocho especies de levaduras fue suficiente para alcanzar valores de soporte $> 60 = 70\%$ de bootstraps (Rokas et al 2003) que son considerados confiables (Hillis y Bull 1993). En este trabajo las filogenias combinadas de los genes *gyrA*, *recA* y *rpoB* aumentaron los valores de soporte en los nodos que soportaron a los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* a excepción de la combinación *gyrA+rpoB* bajo el criterio de MP. El criterio de MP ha sido criticado debido a que no considera la estadística de las características de las secuencias para obtener el mejor modelo evolutivo que cuando es complejo, la probabilidad de recuperar la topología verdadera se deteriora (Yang et al. 1996).

A partir de los resultados de este trabajo, se reconocieron tres clados mayores monofiléticos, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*. *Rhizobium* y *Sinorhizobium* compartieron un ancestro común sin embargo, el clado de *Sinorhizobium* estuvo fuertemente soportado y la ramificación con respecto a *Rhizobium* se encontró en una posición basal tanto en la evidencia total con genes combinados, como en la mayoría de la evidencia individual. *Rhizobium* mostró ser claramente un grupo muy heterogéneo en los intervalos de confianza de las similitudes, a excepción de la filogenia individual de *gyrA* bajo el criterio de inferencia bayesiana. En todas las demás filogenias individuales y combinadas, el género *Sinorhizobium* se mantuvo como un linaje independiente a *Rhizobium* indicando que las especies de *Sinorhizobium* forman un linaje monofilético. Incluso en esta filogenia, las monofilias de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* se recuperaron

como dos clados independientes cuando el grupo IV de *Sinorhizobium* fue excluido. En los intervalos de confianza de similitudes de los genes *gyrA* y *rpoB*, el grupo IV se sobrelapó con *Rhizobium*, sin embargo, a diferencia de *gyrA*, aunque la diferencia entre *Rhizobium* y el grupo IV no fue significativa, la filogenia de *rpoB*, mantuvo al grupo IV separado de *Rhizobium*. Dentro de *Rhizobium*, el gen *recA* mostró la menor heterogeneidad y a excepción de su filogenia individual con MP siempre mantuvo al grupo IV como el grupo más lejano del resto de especies de *Sinorhizobium*, y a *Rhizobium* y *Sinorhizobium* como dos linajes independientes.

El número de operones ribosomales es una de las características cuantificables en procariontes que ha sido propuesta como un componente de su historia de vida porque representa una estrategia ecológica de sobrevivencia (Klappenbach et al. 2000 y 2001, Stevenson et al. 2004). Múltiples copias de genes ribosomales permiten incrementar la tasa de síntesis de rRNA y en consecuencia de ribosomas que le confieren a la bacteria el potencial de responder más rápidamente para fabricar proteínas y crecer en respuesta a un flujo temporal de recursos (Condon et al. 1995, Klappenbach et al. 2000). *Ensifer adhaerens* es una bacteria depredadora que se adhiere a otras bacterias y las lisa (Casida 1982). *E. adhaerens* mostró tener cinco genes 16S rRNA, su pariente más cercano *S. morelense* cuatro, y el resto de especies de *Sinorhizobium* mostró tener de forma homogénea tres copias. El mayor número de operones ribosomales con respecto a sus parientes simbiotes, pudiera proveerle a esta cepa depredadora una ventaja en condiciones fluctuantes para aprovechar el influjo temporal de recursos durante su actividad lítica cuando está presente su hospedero. Sería interesante examinar si su pariente más cercano *S. morelense*, que mostró un carácter intermedio con cuatro operones ribosomales, comparte

también la actividad depredadora con *Ensifer adhaerens*. El número de operones ribosomales conservado en las especies de *Sinorhizobium* grupos I, II y III podría ser considerada como una sinapomorfía que soportara su monofilia y que las distinguiera del grupo IV (*S. morelense*-*Ensifer adhaerens*).

En la mayoría de las filogenias el grupo IV fue el más alejado de las demás especies de *Sinorhizobium* y las diferencias de similitud en los intervalos de confianza fueron significativas, salvo la excepción para *Rhizobium* con *rpoB*. La diferencia en el número de operones ribosomales se puede sumar a estas evidencias como argumentos a favor de considerar al grupo IV de *Sinorhizobium* (antes *Ensifer*) como un grupo hermano pero con un ancestro distinto al resto de especies de *Sinorhizobium*. Si este es el caso, entonces *Sinorhizobium* podría ser retenido como un género *bona fide*. *S. morelense* fue nombrado como último sinónimo de *Ensifer adhaerens* (Young 2003), sin embargo, los valores de similitud en la hibridación DNA-DNA con *Ensifer adhaerens* no fueron mayores al 41% (Willems 2003). Siendo el valor de corte del 70% en la similitud DNA-DNA dentro de la misma especie, una regla importante para definir especies en procariontes (Roselló-Mora y Amann 2000, Stackebrandt et al. 2002), el único cambio aceptable para *S. morelense* sería la transferencia de *S. morelense* a *E. morelense* y el género *Ensifer* quedaría formado por dos especies, *Ensifer adhaerens* y *E. morelense*.

La prioridad de nombre de *Ensifer* sobre *Sinorhizobium* por ser un género descrito con anterioridad que *Sinorhizobium* (Young 2003) que siguió de la propuesta de la fusión de ambos géneros, le da el nombre a las nuevas especies que se describen dentro de este grupo (Lloret et al. 2007), sin embargo, si se consideran las evidencias filogenéticas y metabólica,

se podría enmendar una vez más en la historia de la taxonomía de *Sinorhizobium* su categoría de género.

La filogenia de la simbiosis representada por el gen *nodA* no mostró tener relación con la filogenia de los genes cromosomales sino con la biogeografía o el espectro de hospedero como fue reportado primeramente por Haukka et al. (1998). La historia evolutiva de los genes simbióticos codificados en plásmidos (Martínez-Romero et al. 1990) o islas simbióticas (Sullivan et al., 1998, Gottfert et al. 2001) depende de su interacción con el nicho ecológico que representa su hospedero y debe ser interpretada de forma independiente a la de los genes cromosomales. En trabajos previos, ninguna especie de *Sinorhizobium* africana se agrupó con las americanas, sin embargo, los aislados mexicanos de *Acacia angustissima* lo hicieron con *Sinorhizobium* sp. ORS1044 aislado de *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* natural de Senegal, África (Ba et al. 2002, Moulin et al. 2001). Algunas acacias latinoamericanas introducidas en África pueden ser noduladas con rizobios nativos de África (Räsänen et al. 2001). *S. arboris* HAMBI1552^T y *S. kostiense* HAMBI1679 fueron aisladas en África de nódulos de *Prosopis chilensis* (Nick et al. 1999) que es una leguminosa natural de América. La cepa de *Sinorhizobium* sp. ORS1044 pertenece al grupo de inoculación cruzada *Acacia-Prosopis-Leucaena* (Ba et al. 2002) descrito por Lortet (1996) que contienen factores Nod con grupos R sulfatados y metilados y con grupos carbamoyl. Ensayos de inoculación cruzada entre los sinorhizobia mexicanos con acacias africanas como *A. tortilis* subsp. *raddiana* así como la nodulación de plantas americanas del mismo grupo de inoculación como por ejemplo *Acacia angustissima* y *Leucaena leucocephala*, con el aislado africano *Sinorhizobium* sp. ORS1044 de *A. tortilis* subsp.

raddiana permitirían comprobar si algunos linajes de rizobios americanos y africanos conservan la similitud de los genes de nodulación que les permiten nodular hospederos que divergieron de un mismo ancestro antes de la separación de ambos continentes.

Dentro del grupo I se agruparon las especies y cepas de *Sinorhizobium* con el mayor espectro de hospedero reportadas que son *S. fredii* USDA 257 y la cepa *Sinorhizobium* NGR234 (Pueppke y Broughton, 1999). Ambas cepas forman nódulos y fijan nitrógeno en representantes de las tres subfamilias de leguminosas pero una diferencia interesante entre ambas, es que *S. fredii* forma nódulos y fija nitrógeno en el frijol de soya (*Glycine soja*) y la NGR234 forma nódulos inefectivos en este hospedero. Quizá esto sea debido a que el origen geográfico de *Glycine* spp. (Glycininae) se ubica en norte de China donde *S. fredii* (*R. fredii*) fue primeramente descrita, a diferencia de la NGR234 que fue aislada de nódulos de *Lablab purpureus* (Phaseolinae) en Papua, Nueva Guinea que es una región tropical (Pueppke y Broughton 1999). *Sinorhizobium* sp. NRG234 fue el único de treinta aislados de *L. purpureus* con esas características (Trinick 1980). La filogenia de los genes cromosomales analizados agrupó a esta cepa dentro del grupo I, cerca de *S. xinjiangense*. En algunas ocasiones *S. xinjiangense* se entremezcló con *S. fredii*, sin embargo, el porcentaje de similitud de DNA-DNA entre *S. xinjiangense* CCBAU110 y *S. fredii* USDA 205 es de 39% (Peng et al. 2002) lo que justifica que ambas especies permanezcan separadas o quizá referidas como un mismo genomovar. El porcentaje de similitud DNA-DNA entre *Sinorhizobium* sp. NGR234 y *S. fredii* o *S. xinjiangense* no se conoce por lo que aun no se podría definir a cual de estas dos especies se podría afiliar o si representa un linaje nuevo, que para ser descrito como nueva especie, tendría que contar con un mayor número de representantes. El estudio de la cepa NGR234 ha sido de gran interés por su

amplio espectro de hospedero y la secuencia completa de su plásmido simbiótico ya se encuentra en las bases de datos. Sería interesante asignar el nombre de especie a esta cepa que como único aislado ha cambiado de *Rhizobium* a *Sinorhizobium* y permanecido sin epíteto específico desde su aislamiento.

V Conclusiones

Se encontraron varias evidencias en el presente trabajo que validaron la existencia de *Sinorhizobium* como un taxón independiente que justifica su designación de género. Las filogenias construidas con los genes cromosomales *gyrA*, *recA* y *rpoB* contribuyeron como evidencia independiente y total para agrupar a las especies del género *Sinorhizobium* como un grupo monofilético distinto a *Rhizobium*.

Los datos concatenados permitieron obtener un árbol con un máximo soporte en el brazo que agrupa a *Sinorhizobium* como un grupo monofilético independiente del género *Rhizobium*. El género *Rhizobium* fue claramente un grupo heterogéneo por intervalos de confianza y con la filogenia del gen *rpoB* se separó en dos grupos distintos.

El género *Sinorhizobium* pudo ser reconocido mediante hibridación tipo Southern utilizando como sonda al gen *nolR* y mediante PCR con los oligos diseñados para amplificar a este género. El gen *nolR* podría ser utilizado como marcador molecular para identificar a *Sinorhizobium* spp. en estudios de biodiversidad.

Las especies del género *Sinorhizobium* se agruparon en cuatro grupos. La fusión de los géneros *Ensifer* y *Sinorhizobium* se pone en duda con base en la evidencia filogenética, su separación en los intervalos de confianza de las similitudes entre las secuencias moleculares y su diferencia en el estilo de vida de bacteria depredadora que requiere un mayor número de operones ribosomales para conseguir tasas metabólicas más altas en respuesta a flujos de recursos temporales. La conservación en el número de tres operones ribosomales en las especies de los grupo I, II y III de *Sinorhizobium* podría ser considerada como una sinapomorfía que apoye la categoría de *Sinorhizobium* como un género *bona fide*.

Dentro del grupo III de *Sinorhizobium*, las cepas aisladas de nódulos de la acacia americana, *A. angustissima* en México, pudieron ser distinguidas del resto de especies de este género, principalmente bajo los criterios de: 1. Inferencia filogenética a partir de la comparación de los genes cromosomales *gyrA*, *recA*, *rpoB*, *nolR* y *rrs*; 2. Por el porcentaje de similitud DNA-DNA inferior al 70% con respecto a su pariente más cercano (*S. terangae*); 3. Por MLEE.

Este nuevo linaje que por el criterio del simbiótico *nodA* se agrupó junto las especies descritas de leguminosas naturales de América, fue propuesto para la descripción de una nueva especie americana dentro del género *Sinorhizobium*, que por la fusión con el género *Ensifer*, fue nombrada como *Ensifer mexicanus*.

VI Referencias

- Amarger, N., V. Macheret & G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int J Syst Bacteriol 47, 996-1006.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans Autom Contr 19, 716-723.
- Adékambi, T. & M. Drancourt. 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. Int J Syst Evol Microbiol 54, 2095-2105.
- Ba, S., A. Willems, P. de Lajudie, P. Roche, H. Jeder, P. Quatrin, M. Neyra, M. Ferro, J.C. Promé, M. Gillis, C. Boivin-Masson & J. Lorquin. 2002. Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortillis* subsp. *raddiana* in Africa. Syst Appl Microbiol 25, 130-145.
- Baker R.H. & R. Desalle. 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. Syst Biol 46, 654-73.
- Baldwin I.L. & E.B. Fred. 1929. Nomenclature of the root nodule bacteria of the Leguminosae. J Bacteriol 17, 141-150.
- Boivin, C. & E. Giraud. 1999. Molecular symbiotic characterization of rhizobia, pp. 295-299. Martínez, E. & G. Hernández (Eds). Highlights of Nitrogen Fixation Research, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Brewin N.J., Beringer, J.E. & Johnston, A.W.B. 1980. Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 120, 413-420.
- Brisse, S. & J. Verhoef. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. Int J Syst Evol Microbiol 51, 915-924.
- Brown, J.R. & W.F. Doolittle. 1997. *Archaea* and the Prokaryote-to-Eukaryote transition. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61, 456-502.
- Bull J.J., J.P. Huelsenbeck, C.W. Cunningham, D.L. Swofford & P.J. Waddell. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. Syst Biol 42, 384-97.
- Casida, L.E. Jr. 1982. *Ensifer adherens* gen nov. sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. Int J Syst Bacteriol 32, 339-345.

- Chen, W.X., G.H. Yan & L.J. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J Syst Bacteriol* 38, 392-397.
- Chen, W.X., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Béna & C. Boivin-Masson. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185, 7266–7272.
- Chen, H., K. Gao, E. Kondorosi, A. Kondorosi & B. G. Rolfe. 2005. Functional Genomic Analysis of Global Regulator NolR in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 1340-1352.
- Condon, C., D. Liveris, C. Squires, I. Schwartz & C. L. Squires. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J Bacteriol* 177, 4152–4156.
- Cren M, A. Kondorosi & E. Kondorosi. 1994. An insertional point mutation inactivates NolR repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* 176, 518-9
- Dahllöf, I., H. Baillie, & S. Kjelleberg 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 66, 3376-3380.
- Daubin V., M. Gouy & G. Perriere. 2002. A phylogenetic approach to bacterial phylogeny: evidence of a core of a core of genes sharing a common history. *Genome Res* 12, 1080-1090.
- Debellé, F., C. Plazanet, P. Roche, C. Pujol, A. Savagnac, C. Rosenberg, J.C. Prome & J. Denarie. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol Microbiol* 22, 303-314.
- Debellé, F., L. Moulin, B. Mangin, J. Denarie & C. Boivin. 2001. *nod* genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim. Pol* 48, 359-365.
- de Lajudie. P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M.D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters & M. Gillis. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44, 715-733.
- de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M.D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus & M. Gillis. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48, 369-382.
- de Quiroz, A., M. J. Donoghue & J. Kim. 1995. Separate versus combined análisis of phylogenetic evidence. *Ann Rev Ecol Syst* 26, 657-81.

DelVecchio, V.G., V. Kapatral, R.J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P.H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J.J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides, & R. Overbeek. 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci* 99, 443-448.

Deschodt, C.C. & B.W. Strijdom. 1976. Effective nodulation of *Aspalathus linearis* spp. by rhizobia from other *Aspalathus* species. *Phytophylactica* 8, 103-104.

Dreyfus, B.L. & Y. Dommergues. 1981. Nodulation of *Acacia* species by fast and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl Environ Microbiol* 41, 97-99.

Eisen, J. 1995. The RecA protein as a model molecule for molecular systematics studies of Bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J Mol Evol* 41, 1105-1123.

Eardly, B.D., F.S. Wang, T.S. Whittam & R.K. Selander. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* 61, 507-512.

Eardly, B.E., L.A. Materon, N.H. Smith, D.A. Johnson, M.D. Rumbaugh & R.K. Selander. 1990. Genetic of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 56, 187-194.

Eardly, B.D., S.M. Nour, P. van Berkum & K. Selander. 2005. Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: Mosaicism and uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galega*. *Appl Environ Microbiol* 71, 1328-1335.

Farris, J.S. 1989. Quantitative characters and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5, 417-419.

Farris J.S., M. Källersjö, A.G. Kluge & C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39,783-791.

Frank, B. 1879. Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwillungen der Papilionaceen. *Bot. Ztg* 37,376-387, 394-399.

Fred, E.B., I.L. Baldwin & E. McCoy. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison.

Galibert F., T.M. Finan, S.R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M.J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R.W. Davis, S. Dreano, N.A. Federspiel, R.F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernández-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R.W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M.L. Kahn, S. Kalman, D.H. Keating,

E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M.C. Peck, T.M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F.J. Vorholter, S. Weidner, D.H. Wells, K. Wong, K.C. Yeh & J. Batut. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668-672.

Gaunt, M.W., S.L. Turner, L. Rigottier-Gois, S.A. Lloyd-Macgilp & J.P.W. Young. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 2037-2048.

Goldman, N., Anderson, J.P. & Rodrigo, A.G. 2000. Likelihood-based tests of topologies in phylogenetics. *Syst Biol* 49, 652–670.

González, V., P.Bustos, M.A. Ramírez-Romero, A. Medrano-Soto, H. Salgado, I. Hernández-González, J.C. Hernández-Celis, V. Quintero, G. Moreno-Hagelsieb, L. Girard, O. Rodríguez, M. Flores, M.A. Cevallos, J. Collado-Vides, D. Romero & G. Dávila. 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology* 4, R36

Gottfert, M., S. Rothlisberger, C. Kundig, C. Beck, R. Marty & H. Hennecke. 2001. Potential symbiosis- specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bacteriol* 183, 1405-1412.

Guindon, S., & O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood, *Syst Biol* 52, 696-704.

Hall T.A. 1999. Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.

Haukka, K., K. Lindström, & J. P. W. Young. 1996. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *Syst Appl Microbiol* 19, 352-359.

Haukka, K., K. Lindström & P.J.W Young. 1998. The phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol* 64, 419-426.

Henz, S.R., D. H. Huson, A.F. Auch, K. Nieselt-Struwe & S.C. Schuster. 2005. Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics* 21, 2329-2335.

Hillis D.M. & J.J Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42, 182-192.

Holmes, B. M. Popoff, M. Kiredjian & M. Kersters. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int J Syst Bacteriol* 38, 406-416.

Huelsenbeck J.P. & B. Rannala. 1997. Phylogenetic methods come of age: Testing hypothesis in an evolutionary context. *Science* 276, 227-32.

Frank, B. 1879. Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwillungen der Papilionaceen. Bot Ztg 37,376-387, 394-399.

Jarvis, B.D.W., H.L. Downer & J.P.W. Young. 1992. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating Rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii* Int J Syst Bacteriol 42, 93-96.

Jarvis, B.D.W., P. van Berkum, W.X. Chen, S.M. Nour, M.P. Fernández, J.C. Cleyet-Marel & M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 47, 895-898.

Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int J Syst Bacteriol 32, 136-139.

Jordan, D.C. 1984. *Rhizobiaceae* Conn 1938, p. 234-254. In N.R. Kreig & J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1 The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada M. Yamada, & S. Tabata. 2002. Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Research 9, 225-256.

Khamis, A., P. Colson, D. Raoult & B. La Scola. 2003. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afipia* and *Bosea* Species, Including a Strategy for Choosing Discriminative Partial Sequences. Appl Environ Microbiol 69, 6740-6749.

Kiss, E., P. Mergaert, B. Olah, A. Kereszt, A., C. Staehelin, A. Davies, J.A. Downie & E. Kondorosi. 1998. Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the Rhizobiaceae family. Mol Plant Microbe Interact 11, 1186-1195.

Klappenbach, J. A., J. M. Dunbar & T. M. Schmidt. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl Environ Microbiol 66, 1328-1333.

Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole & T. M. Schmidt. 2001. *rrndb*: the ribosomal RNA operon copy number database. Nucleic Acids Res 29, 181-184.

Kluge, A.G. 1989. A concern for evidence and phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). Syst Zool 38, 7-25.

Kondorosi E, M. Pierre, M. Cren, U. Haumann, M. Buire, B. Hoffmann, J. Schell & A. Kondorosi. 1991. Identification of *NolR*, a negative transacting factor controlling the nod regulon in *Rhizobium meliloti*. J Mol Biol 222, 885-96.

- Krishnan, H.B. & S.G. Pueppke. 1991. Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes *Mol Plant Microb Interact* 4, 512-520
- Lafay, B. & J.J. Burdon. 1998. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in Southeastern Australia. *Appl Environ Microbiol* 64, 3989-3997.
- Laguerre, G., S.M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin & N. Amarger. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol* 147, 981-93.
- Lapage, S.P., P.H.A. Sneath, E.F. Lessel, V.B.D. Skerman, H.P.R. Seeliger & W.A. Clark (editors) 1992. International code of nomenclature of Bacteria. (1990) Revision. *Bacteriological Code*. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 39, 365-367.
- Lloret L., E. Ormeño-Orrillo, R Rincón, J Martínez-Romero, M.A. Rogel-Hernández & E. Martínez-Romero. 2007. *Ensifer mexicanum* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol* (In Press).
- Lortet, G., N. Méar, J. Lorquin, B. Dreyfus, P. de Lajudie, C. Rosenberg & C. Boivin. 1996. Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: Application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga*, and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol Plant Microb Int* 9, 736-747.
- Ludwig, W., J., Neumaier, N. Klugbauer, E. Brockmann, C. Roller, S. Jilg, K. Reetz, I. Schachtner, A. Ludvigsen, M. Bachleitner, U. Fisher & K.H. Schleifer. 1993. Phylogenetic relationships of Bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase β -subunit genes. *Antonie Leeuwenhoek* 64, 285-305.
- Madisson, W.P. 1997. Gene trees in species trees. *Syst Biol* 46, 523-536.
- Maslin B.R., J.T. Miller, & D.S. Seigler. 2003. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* 16, 1-18.
- Martínez-Romero, E., D. Romero & R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit Rev Plant Sci* 9, 59-93.
- Martínez-Romero, E., L. Segovia, F.M. Mercante, A.A. Franco, P. Graham & M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* 41, 417-426.
- Martínez-Romero, E. & J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci* 15, 113-140.

- Meade H.M., S.R.Long, G.B.Ruvkun, S.E. Brown & F.M. Ausubel. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149, 114-122.
- Miyamoto, M.M. & W.M. Fitch. 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Syst Biol* 44, 64-76.
- Moreira, F.M.S., K. Haukka & J.P.W. Young. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol Ecol* 7, 889-895.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. *Nature* 411, 948-950.
- Moulin, L. G. Béna, C. Boivin-Masson & T. Stepkowski. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 720-732.
- Nichols, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16, 358-363.
- Nick, G., P. de Lajudie, B.D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis & K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1359-1368.
- Nuti, M.P., A.A. Lepidi, R.K. Prakah, R.A. Schilperootl & F.C. Cannon. 1979. Evidence of nitrogen fixation (nif) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature (London)* 282, 533-535.
- Oyaizu, H., S. Matsumoto, K. Minamisawa & T. Gamou. 1993. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. *J Gen Appl Microbiol* 39, 339-354.
- Peng, G.X., Z.Y. Tan, E.T. Wang, B. Reinhold-Hurek, W.F. Chen & W.X Chen. 2002. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjing region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 457-462.
- Philippe, H., F. Delsuc, H. Brinkmann & N Lartillot. 2005. Phylogenomics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36,541-62.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations, *Proc Natl Acad Sci* 98, 13757-13762.
- Pueppke, S.G. & W.J. Broughton. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share excepcionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 293-318.

- Räsänen, L., J.I. Sprent & K. Lindström. 2001. Symbiotic properties of sinorhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis* nodules in Sudan and Senegal. *Plant and Soil* 235, 193-210.
- Rico, L. 2007. A checklist and synopsis of american species of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). CONABIO, en prensa.
- Rodrigo, A., M. Kelly-Borges, P. R. Bergquist & P. Bergquist. 1993. A randomization test of the null hypothesis that two cladograms are sample estimates of a parametric phylogenetic tree. *N Z J Bot* 31, 257-268.
- Rokas, A. B.L. Williams, N. King & S.B. Carroll. 2003. Genome-Scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425, 798-804.
- Rokas, A. & S. Carroll. 2005. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Mol Biol Evol* 22, 1337-44.
- Rome, S., M.P. Fernández, B. Brunel, P. Normand & J.C. Cleyet-Marel. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol* 46, 972-980.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck. 2003. MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Roselló-Mora, R. & R. Amann. 2000. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25, 39-67.
- Rosenblueth, M., L. Martínez, J. Silva & E. Martínez-Romero. 2003. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol* 27, 27-35.
- Sawada, H., L.D. Kuykendall & J.M. Young. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49, 155-179.
- Scholla, M.H. & G.H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast growing species that effectively nodulates soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 34, 484-486.
- Segovia, L., J.P.W. Young & E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43, 374-377.
- Shaffer H.B., J.M. Clark & F. Kraus 1991. When molecules and morphology chash: a phylogenetic analysis of the North American ambystomatid salamanders (Caudata: Ambystomatidae). *Syst Zool* 40, 284-303.
- Silva C., P. Vinuesa, L.E. Eguiarte, V. Souza & E. Martínez-Romero, E. (2005). Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol Ecol* 14, 4033-4050.

Snel, B., P. Bork & M.A. Huynen. 1999. Genome phylogeny based in gene content. *Nat Genet* 21, 108-110.

Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G.M. Garrity, A.D. Grimont, P. Kämpfer, M.C.J. Maiden, X. Nesme, R. Roselló-Mora, J. Swings, H.G. Trüper, L.Vauterin, A.C. Ward & W.B. Whitman. 2002. Report of the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1043-1047.

Stepkowski, T., M. Czaplinska, K. Miedzinska & L. Moulin. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol* 26, 483-94.

Stevenson, B.S. & T.M. Schmidt. 2004. Life History Implications of rRNA Gene Copy Number in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70, 6670-6677.

Sullivan, J.T., N.P. Heather, W.L. Lowther, D.B. Scott & C.W. Ronson. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci* 92,8985-8989.

Sullivan, J.T. & C.W. Ronson. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci* 95, 5145-5149.

Sullivan, J.T., J.R. Trzebiatowski, R.W. Cruickshank, J. Gouzy, S.D. Brown, R.M. Elliot, D.J. Fleetwood, N.G. McCallum, U. Rossbach, G.S. Stuart, J.E. Weaver, R.J. Webby, F.J. de Bruijn & C.W. Ronson. 2002. Comparative sequence analysis of the symbiotic island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184, 3086-3095.

Swofford D.L. 1991. When are phylogeny estimates from molecular and morphological data incongruent? In: *Phylogenetic analysis of DNA sequences*. Ed. M.M. Miyamoto, J. Cracraft. Pp. 295-333. New York, Oxford Univ. Press

Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. García, A. Willems, P. de Lajudie, I. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson & B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183, 214-220.

Toledo, I., L. Lloret & E. Martínez-Romero. 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst Appl Microbiol* 26, 54-64.

Torres, C.A. 2005. Transferencia y función en fondos genómicos heterólogos del plásmido simbiótico de *Rhizobium tropici* y *Burkholderia tuberum*. Tesis profesional para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Trinick, M.J. 1980. Relationships among the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J Appl Bacteriol* 49, 39-53.

Turner, S.L. & J.P. Young. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* 17, 309-319.

van Berkum, P, Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindström, & B. D. Eardly. 2003. Discordant Phylogenies within the *rrn* Loci of Rhizobia. *J Bacteriol* 185, 2988–2998.

van Rhijn, P., J. Desair, K. Vlassak, and J. Vanderleyden. 1994. The NodD proteins of *Rhizobium* sp. strain BR816 differ in their interactions with coinducers and in their activities for nodulation of different host plants. *Appl Environ Microbiol* 60, 3615-3623.

Velázquez, E., J.M. Igual, A. Willems, M.P. Fernández, E. Muñoz, P.F. Mateos, A. Abril, N. Toro, P. Normand, E. Cervantes, M. Gillis & E. Martínez-Molina. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1011–1021.

Vinuesa, P., M. Leon-Barrios, C. Silva, A. Willems, A. Jarabo-Lorenzo, R. Perez-Galdona, D. Werner & E. Martínez-Romero. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont isolated from the nodules of endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteae) growing in the Canary Islands. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 569-575.

Vinuesa, P., M. Leon-Barrios, C. Silva, A. Willems, A. Jarabo-Lorenzo, R. Perez-Galdona, D. Werner & E. Martínez-Romero. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont isolated from the nodules of endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteae) from the Canary Islands along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 569-575.

Vinuesa, P., C. Silva, M.J. Lorite, M.L. Izaguirre-Mayoral, E.J. Bedmar & E. Martínez-Romero. 2005. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs* *atpD* *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst Appl Microbiol* 28, 702-16.

Vinuesa, P., C. Silva, D. Werner & E. Martinez-Romero. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34, 29–54.

Wang, E.T., P. van Berkum, D. Beyene, X.H. Sui, O. Dorado, W.X. Chen & E. Martínez-Romero. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bacteriol* 48, 687-699.

Wang, E.T., J. Martínez-Romero & E. Martínez-Romero. 1999. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils *Mol Microbiol* 8, 711-724.

- Wang, E.T., M.A. Rogel, A. García-de los Santos, J. Martínez-Romero, M.A. Cevallos & E. Martínez-Romero. 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. Int J Syst Bacteriol 49, 1479-91.
- Wang, E.T., Z.Y. Tan, A. Willems, M. Fernández-López, B. Reinhold-Hurek & E. Martínez-Romero. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. Int J Syst Evol Microbiol 52, 1687-1693.
- Wang E.T., F.L.Kan, Z.Y. Tan, I. Toledo, W.X. Chen & E. Martínez-Romero. 2003. Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. Arch Microbiol 180, 444-454.
- Wang, F.Q., E.T. Wang, Y.F. Zhang & W.X. Chen. 2006. Characterization of rhizobia from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. Syst Appl Microbiol 29, 502-17.
- Wei, G.H., E.T. Wang, Z.Y. Tan, M.E. Zhu & W.X. Chen. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. Int J Syst Evol Microbiol 52, 2231-2239.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier & D. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for Phylogeneic study. Journal of Bacteriology 173, 697-703.
- Wernegreen, J.J. & M.A. Riley. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. Mol Biol Evol 16, 98-113.
- Willems, A., M. Fernández-López, E. Muñoz-Adelantado, J. Goris, P. De Vos, E. Martínez-Romero, N. Toro & M. Gillis. 2003. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1207-1217.
- Wilson, J.K. 1944. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. Soil Sci 58, 61-69.
- Woese, C. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271.
- Woese, C. 2002. On the evolution of cells. Proc Natl Acad Sci 99, 8742-8747.
- Xia X, Z. Xie, M. Salemi, L. Chen & Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. Molecular Phylogenetics and Evolution 26, 1-7.
- Yanagi, M. & K. Yamasato. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol Lett 107, 115-120.

Yang, S., R.F. Doolittle & P.E. Bourne. 2005. Phylogeny determined by protein domain content. *Proc Natl Acad Sci* 102, 373-378.

Yang, Z. 1996. Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods. *J Mol Evol* 42, 294-307.

Young, J.M., L.D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. 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* as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51,89-103.

Young, J.M. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens* (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 2107-2110.

Young, J.P.W. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant Soil* 186,45–52.

Young, J.P.W. & K.E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol* 133, 87-94.

Young, J.P.W., L.C. Crossman, A.W.B. Johnston, N.R. Thomson, Z.F. Ghazoui, K.H. Hull, M. Wexler, A.R.J. Curson, J.D. Todd, P.S. Poole, T.H. Mauchline, A.K. East, M.A. Quail, C. Churcher, C. Arrowsmith, I. Cherevach, T. Chillingworth, K. Clarke, A. Cronin, P. Davis, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabinowitsch, M. Sanders, M. Simmonds, S. Whitehead & J. Parkhill. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology* 7:R34.

Zang, X., R. Harper, M. Karsisto & K. Lindström. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int J Syst Bacteriol* 41,104-113.

Zuckerandl, E. & Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* 8, 357-66.

Apéndice 2. Números de acceso en el GenBank de las secuencias utilizadas de los genes cromosomales. A excepción de las secuencias en gris, todas las demás fueron generadas en el presente trabajo.

Género o grupo	Cepa	<i>gyrA</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>noIR</i>
Sinorhizobium I	<i>Sinorhizobium americanum</i> CFN EI156 ^T	DQ411889	DQ411943	DQ411956	DQ411911
	<i>S. americanum</i> CFN EI154	EF027969	EF027939	EF027902	EF174160
	<i>S. americanum</i> CFN EI15	EF027970	EF027940	EF027903	EF174161
	<i>Sinorhizobium</i> sp. BR816	EF027992	EF027960	EF027924	EF174175
	<i>Sinorhizobium</i> sp. Le39	EF027995	EF027963	EF027927	EF174177
	<i>Sinorhizobium</i> sp. Lc56	EF027996	EF027964	EF027928	EF174176
	<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	EF027993	EF027961	EF027925	AY194598
	<i>S. xinjiangense</i> CCB AU110 ^T	DQ411890	DQ411944	DQ411958	DQ411910
	<i>S. xinjiangense</i> CCB AU107	EF027971	EF027941	EF027904	EF174174
	<i>Sinorhizobium</i> sp. GRX8	EF027994	EF027962	EF027926	EF174178
	<i>S. fredii</i> USDA205 ^T	DQ411891	AJ294379	DQ411957	AY194594
	<i>S. fredii</i> USDA257	EF027973	EF027942	EF027906	AY194595
Sinorhizobium II	<i>S. arboris</i> HAMB11552 ^T	DQ411892	DQ411946	DQ411959	DQ411912
	<i>S. arboris</i> HAMB11624	EF027974	EF027943	EF027907	EF174163
	<i>S. arboris</i> HAMB11396	EF027975	EF027944	EF027908	EF174162
	<i>S. kostiense</i> HAMB11489 ^T	DQ411893	DQ411947	DQ411960	DQ411913
	<i>S. kostiense</i> HAMB11501	EF027976	EF027945	EF027909	EF174164
	<i>S. kostiense</i> HAMB11679	EF027977	EF027946	EF027910	EF174165
	<i>S. meliloti</i> 1021	AL591688.1	AL591688.1	AL591688.1	AL591688.1
	<i>S. meliloti</i> USDA 1002 ^T	DQ411895	AJ294382	DQ411964	DQ411914
	<i>S. meliloti</i> CC2013	EF027980	EF027949	EF027913	EF174170
	<i>S.</i> CCB AU71714	DQ411896	DQ411945	DQ411965	DQ411918
	CCBAU71713	EF027982	EF027951	EF027915	EF174166
	CCBAU71715	EF027981	EF027950	EF027914	EF174167
	<i>S. medicae</i> A321	DQ411897	AJ294381	DQ411963	DQ411915
	<i>S. medicae</i> M3	EF027983	EF027952	EF027916	EF174168
	<i>S. medicae</i> M102	EF027984	EF027953	EF027917	EF174169
	<i>S. sahelii</i> ORS600	DQ411898	AJ294380	DQ411966	DQ411917
	<i>S. sahelii</i> ORS611	EF027986	EF027954	EF027919	EF174173
<i>S. sahelii</i> HAMB11496	EF027987	EF027955	EF027920	EF174172	
Sinorhizobium III	<i>S. teranga</i> ORS1009 ^T	DQ411899	AJ294383	DQ411967	DQ411919
	<i>S. teranga</i> ORS1073	DQ411900	DQ411949	DQ411968	DQ411920
	<i>S. teranga</i> ORS19	DQ411901	DQ411950	DQ411969	DQ411921
	<i>S. teranga</i> ORS604	DQ411902	DQ411948	DQ411970	DQ411922
	<i>Ensifer mexicanus</i> ITTG R7 ^T	DQ411904	DQ411951	DQ411971	DQ411923
	<i>E. mexicanus</i> ITTG_R4	DQ411903	EF198420	DQ411972	DQ411924
	<i>E. mexicanus</i> ITTG_S4	DQ411907	EF198421	DQ411975	DQ411925
	<i>E. mexicanus</i> ITTG_S64	DQ411908	DQ411955	DQ411976	DQ411926
	<i>E. mexicanus</i> CFN_SH1	DQ411906	DQ411952	DQ411973	DQ411927
	<i>E. mexicanus</i> CFN_SH3	DQ411905	DQ411953	DQ411977	DQ411928
	<i>E. mexicanus</i> CFN_SH4	DQ411909	DQ411954	DQ411974	DQ411929
	<i>Sinrhizobium</i> sp. ITTG_R11	EF463928	EF463924	EF457951	EF174179
	<i>Sinorhizobium</i> sp. ITTG_S68	EF463929	EF463925	EF457948	EF174180
	<i>Sinorhizobium</i> sp. ITTG_S70	EF463930	EF463926	EF457949	EF174181
<i>Sinorhizobium</i> sp. ITTG_S71	EF463931	EF463927	EF457950	EF174182	
Sinorhizobium IV (<i>Ensifer</i>)	<i>E. adhaerens</i> ATCC33499	DQ411894	EF027947	DQ411962	
	<i>Ensifer</i> sp. EC1002	EF027979	EF027948	EF027912	
	<i>S. morelense</i> (<i>E. morelense</i>) LcO4 ^T	EF198422	AJ50560	DQ411961	DQ411916
	<i>S. morelense</i> (<i>E. morelense</i>) Lc57	EF027988	EF027956	EF027921	EF174171

Apéndice 2. continuación.

Género o grupo	cepa	<i>gyrA</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>
<i>Rhizobium-Agrobacterium</i>	<i>R. elti</i> CFN42	CP000133.1	CP000133.1	CP000133.1
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA2370 ^T	EF198419	AJ294376	EF202569
	<i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042	EF027997	EF027965	EF027929
	<i>R. gallicum</i> R602sp ^T	EF027998	AY907357	EF027930
	<i>R. huautlense</i> SO2 ^T	EF027999	AY688601	EF027931
	<i>R. galegae</i> USDA 4128 ^T	EF028000	EF027966	EF027932
	<i>R. tropici</i> CFN299	EF028001	AJ294372	EF027933
	<i>R. tropici</i> CIAT899 ^T		AJ294373	EF457940
	<i>A. rhizogenes</i> Chag4	EF028002	EF027967	EF027934
	<i>A. rhizogenes</i> Kag3	EF028003	EF027968	EF027935
	<i>A. tumefaciens</i> C58	AE008688.1	AE008688.1	AE008688.1
	<i>R. yanglingense</i> CCBAU 71623 ^T		AY907359	EF457941
	<i>R. mongolense</i> USDA1844 ^T		AY907358	EF457942
	<i>R. undicola</i> LMG11875 ^T		EF457952	EF457943
	<i>R. loessense</i> CCBAU7190B ^T			EF457944
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i> USDA3471 ^T	EF028004	AJ294371	EF027936
	<i>M. mediterraneum</i> USDA3392 ^T	EF028005	AJ294369	EF027937
	<i>M. tianshanense</i> CCBAU3306 ^T		AJ294368	EF457946
	<i>M. plurifarum</i> LMG11892 ^T	EF028006	AY688611	EF027938
	<i>M. amorphae</i> ACCC19665 ^T		AY688612	EF457947
	<i>M. ciceri</i> USDA3383 ^T		AJ294367	EF457945
	<i>M. huakuii</i> MAFF303099	BA000012.4	BA000012.4	BA000012.4
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> USDA110	BA000040.2	BA000040.2	BA000040.2