



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis ecológico y evolutivo de rizobios
asociados a *Phaseolus vulgaris* y *Acacia* spp. en
diferentes ecosistemas de Morelos, México**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

QBP. FABIOLA MIRANDA SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN (CCG)

COMITÉ TUTORAL
DRA SUSANA BROM KLANNER (CCG)
DR. DANIEL PIÑERO DALMAU (IE)

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2016



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.

I. Índice

I. Índice	2
II. Resumen	5
III. Abstract	7
IV. Agradecimientos.....	9
a. Financiamiento	9
b. Personales.....	9
1. Introducción	11
1.1 Ecología molecular de los rizobios y su interacción con plantas leguminosas.....	11
1.2 Mecanismos de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa	12
1.3 La familia <i>Leguminosae</i>	13
1.3.1 Definición de hábitat y nicho	14
1.3.2 Definición de rizosfera y rizoplaneo	14
1.3.3 Modelo multipasos de adquisición y diferenciación de la microbiota de la raíz	15
1.4 Los rizobios presentan diferentes estilos de vida.....	16
1.5 Factores asociados a la distribución de microorganismos en el suelo	16
1.6 Factores asociados a la distribución de rizobios	17
1.7 Especies de rizobios simbiotes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
1.8 Simbiovariedades asociadas a la nodulación en frijol	19
1.9 Distribución de rizobios asociados al frijol en México.....	20
1.10 Simbiotes de las leguminosas del género <i>Acacia</i> y su distribución en México.....	20
1.11 El estado de Morelos como escenario para el estudio de la ecología y diversidad de los rizobios.....	21
1.12 Aproximaciones metodológicas para el estudio de la diversidad de los rizobios considerando sus diferentes estilos de vida	22
2. Justificación del proyecto de doctorado.....	27
3. Objetivo general.....	29
3.1 Objetivos particulares.....	29
4. Materiales y métodos.....	30
5. Resultados.....	32

5.1.1	Patrones de diversidad de las comunidades de la familia <i>Rhizobiaceae</i> que habitan suelo, rizoplano y nódulos revelan una fuerte selección de los rizobios por las leguminosas.....	32
6.	Resultados adicionales.....	91
6.1.1	Elección del punto de corte al 94% para la definición de OTU's para la estima de la diversidad α	91
6.1.2	Validación de la estrategia de aislamiento de rizobios de nódulo por trapeo con frijol usando suelo de bosque de pino y encino como método para la recuperación de la diversidad sin sesgos significativos	93
6.1.3	Determinación de factores ambientales y de hospedero que afectan la diversidad y la distribución de rizobios simbióticos en Morelos y Guanajuato	95
6.1.3.1	Recuperación de linajes simbióticos de los diferentes sitios muestreados y los diferentes hospederos.....	97
6.1.3.2	Distribución de los linajes simbióticos por ecosistemas, pH y hospederos	98
6.1.3.3	Rango de nodulación de las leguminosas hospederas probadas ..	103
6.1.3.4	Diversidad genética de las especies de rizobios más abundantes	106
6.1.3.5	Evaluación de la diversidad de rizobios simbióticos recuperada por las variedades cultivadas de frijol negro Xamapa y rojo colorado en diferentes ecosistemas	106
6.1.3.6	Simbiovariedades en los sitios muestreados: análisis de los genes simbióticos <i>nifH</i> , <i>nodC</i> y <i>nodA</i>	107
6.1.3.7	Distribución de los linajes y las simbiovariedades encontradas en sitios de diferentes ecosistemas de Morelos y Guanajuato.	111
7.	Discusión general	112
7.1	Patrones de diversidad de las comunidades de la familia <i>Rhizobiaceae</i> que habitan suelo, rizoplano y nódulos revelan una fuerte selección de los rizobios por las leguminosas.....	112
7.1.1	Las leguminosas filtran la diversidad de las comunidades de rizobios del suelo en el rizoplano y nódulo.....	114
7.1.2	Los linajes rizobianos de las comunidades del suelo, rizoplano y nódulo presentaron una distribución de cola larga tipo "biosfera rara".....	115
7.1.3	La estructura de las comunidades de rizobios del suelo, rizoplano y nódulo soportan el "modelo multipasos" de adquisición de la microbiota de las raíces	115
7.1.4	El hospedero también selecciona a nivel intra-específico: Haplotipos generalistas y especialistas	116

7.2 Factores ambientales y de hospedero afectan la diversidad y la distribución de rizobios simbióticos en Morelos y Guanajuato	118
7.2.1 El tipo de vegetación y el pH del suelo son determinantes clave en la distribución de los rizobios de nódulo	119
7.2.2 Las leguminosas hospederas probadas tienen un amplio rango de nodulación con especies de rizobios generalistas y especialistas	120
7.2.3 No hay diferencias significativas en la recuperación de rizobios simbióticos en las variedades de frijol cultivadas en los diferentes ecosistemas analizados	121
7.2.4 Se encontraron cuatro clados de alelos simbióticos en diferentes ecosistemas de Morelos y Guanajuato.	122
8. Conclusiones	124
9. Perspectivas	125
10. Bibliografía.....	126
11. Apéndice 1: Material y métodos adicionales.....	136
a. Medios de cultivo empleados.....	136
b. Oligonucleótidos	139
c. Extracción de plásmidos en formato de placas de 96 pozos	139
12. Apéndice 2: Colección de aislados de rizobios simbióticos.....	141
13. Apéndice 3: Colección de aislados de rizobios de rizoplano	154

II. Resumen

Los rizobios se pueden encontrar en diferentes ambientes como suelos y sedimentos. Forman parte del microbioma de diferentes órganos y tejidos de plantas. Sin embargo, las estimas actuales de diversidad están basadas esencialmente en el análisis de aislados provenientes de nódulos en las raíces de leguminosas, mientras que las comunidades que se encuentran en el suelo y en el rizoplasma han permanecido poco exploradas. Conscientes de estos grandes huecos en la ecología de este grupo bacteriano, en esta tesis nos propusimos responder las siguientes preguntas: a) ¿Cuál es la magnitud de la diversidad alfa y beta de la familia *Rhizobiaceae* en un suelo conservado de un ecosistema rico y diverso en especies de leguminosas?, b) ¿Cómo se compara con la diversidad de suelos agrícolas cercanos? y c) ¿Qué tan fuerte es la selección del hospedero en la estructuración de la diversidad rizobiana en el rizoplasma y los nódulos?

Para responder a las dos primeras preguntas, elegimos un sitio conservado de Selva Baja Caducifolia (SBC) del estado de Morelos y dos sitios agrícolas cercanos. Desarrollamos oligonucleótidos para el gen *recA* dirigidos para la familia *Rhizobiaceae*, los cuales tuvieron alta especificidad y gran cobertura para este grupo, y secuenciamos amplicones generados de las comunidades de los suelos a partir de una extracción de DNA metagenómico. Para responder a la tercera pregunta, los datos generados anteriormente se compararon con secuencias *recA* de aislados obtenidos de dos especies nativas de *Acacia* y dos variedades cultivadas de *Phaseolus vulgaris* (frijol común), las cuales actuaron como plantas trampa (Miranda-Sánchez et al., 2015). En ésta publicación nuestra estima de la diversidad de la familia *Rhizobiaceae* estuvo basada en 413 secuencias *recA* de librerías de amplicones de DNA metagenómico del suelo y en 298 y 284 de aislados de nódulo y rizoplasma, respectivamente. En total se recuperaron 21 linajes de rizobios de los tres hábitats muestreados. Se logró un buen esfuerzo de muestreo de las comunidades y se encontró una distribución de cola larga tipo “biosfera-rara” de las especies rizobianas en suelo, rizoplasma y nódulo.

Análisis comparativos de los patrones de diversidad alfa y beta, así como análisis multivariados, de los tres hábitats muestreados (suelo, rizoplasma y nódulo), de los cuatro hospederos y de los tres sitios, mostraron que los hospederos ejercen una mayor selección sobre los rizobios con los que se asocian, que el régimen de uso de

los suelos estudiados. También se observó que sólo una pequeña y específica fracción de la comunidad de los rizobios se asocia a las plantas hospederas en una forma género-específica. Además, se detectaron genotipos especialistas y generalistas para la nodulación con los hospederos en las dos especies dominantes en los nódulos. Se encontró a la especie *Rhizobium etli* como generalista y dominante del ecosistema. Noduló preferencialmente a las especies de *Acacia* sobre *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, un miembro raro de la comunidad del suelo, que representa un nuevo linaje del género *Rhizobium*, fue el ocupante dominante de los nódulos de frijol y la mayoría de sus genotipos fueron especialistas. Una filogenia del gen *nodC* reveló que la simbiovar *mimosae* es la más abundante en la población muestreada de *R. etli*. El gen *nodC* fue detectado en sólo el 20% (n=40) de los aislados de rizopiano de *R. etli*. Hasta este momento, este es el inventario más grande de las especies de la familia *Rhizobiaceae* reportado para una sola región.

Derivado de nuestros hallazgos, se amplió la exploración de aislados de nódulo a otros ecosistemas del estado de Morelos, con pH's y uso de suelo contrastantes, con la finalidad de conocer los factores del suelo y hospedero condicionantes de la distribución y diversidad de los rizobios en este hábitat. Se utilizaron diferentes variedades cultivadas de frijol y leguminosas mimosoides como hospederos, utilizando como inóculo suelos del estado de Morelos y un suelo de un sitio agrícola intensivo de frijol en Guanajuato.

Como resultado de esta parte se mostró que la SBC es el ecosistema con más diversidad de rizobios de nódulo (15 linajes) y que en este ecosistema dominaron únicamente *R. etli* y *Rhizobium* sp1. En el Bosque de Pino y Encino (BPE) se recuperó mayoritariamente a *R. leucaenae* y *R. leguminosarum*-like con diferencias en la recuperación atribuidas al pH de cada sitio, mientras que en suelos alcalinos se encontró principalmente a *Sinorhizobium americanum*. En el sitio agrícola intensivo de Guanajuato predominó *R. phaseoli*. Se detectaron cuatro clados de alelos simbióticos en los sitios muestreados: *mimosae* en SBC, *tropici* en SBC y BPE, *mediterraneanense* en suelos alcalinos y *phaseoli* en Guanajuato (en todos los aislados de *R. phaseoli*) y en BPE (aislados de *R. leguminosarum*-like). Los resultados de esta tesis se discutieron a la luz de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y a los recientes hallazgos en Ecología de comunidades microbianas, así como en la adquisición del microbioma de la raíz.

III. Abstract

Rhizobia thrive in diverse environments such as soils and sediments. They form part of the microbiome of different organs and tissues of plants. However, current diversity estimates are mostly based on analyses of legume root-nodule isolates, while communities living in the bulk-soil and root surfaces remain hardly explored. Aware of this major gap in the ecology of this microbial group, in this thesis propose to answer the following main questions: a) What is the magnitude of alpha diversity of the *Rhizobiaceae* family in soils of a well preserved ecosystem rich in diverse legumes species?, b) How does it compare with that of nearby agricultural soils? and, c) How strong is host selection in structuring rhizobial diversity on legume root surfaces and in nodules?

To answer the first two questions we chose a conserved seasonally-dry tropical forest (SDTF) site in Morelos, central Mexico and two nearby agricultural fields. We developed *recA* primers targeting *Rhizobiaceae* with high specificity and broad group coverage, and sequenced amplicons generated from community DNA extracted from soil samples collected at the sites mentioned above. To answer the third one, these data were compared with *recA* sequences generated from isolates obtained from two dominant native *Acacia* species and two *Phaseolus vulgaris* (common bean) cultivars used as trap plants (Miranda-Sánchez et al., 2015). In this publication our diversity assessment of *Rhizobiaceae* family in the first part of this work was based on 413 *recA* sequences obtained from bulk-soil libraries, 284 and 298 from nodule and root-surface isolates, respectively. A total of twenty-one rhizobial lineages were recovered from the three sampled habitats. A good sampling effort of the target communities was achieved and a "rare biosphere"-like long-tail distribution of rhizobial species was found in soils, root surfaces and nodules.

Comparative analyses of the patterns of alpha- and beta-diversity and multivariate analyses across the three habitats sampled (soil, root-surfaces and nodule), four hosts and three sites, demonstrated that the hosts exert a stronger selection for the partners they associate with than the land-usage regime. Also, it was observed that only a small and specific fraction of the whole soil rhizobial community was found associated with the host plants, in a genus-specific manner. Moreover specialist and generalist genotypes for host nodulation were detected in the populations of the two

dominant species recovered from nodules. *Rhizobium etli* was found to be a generalist and dominant species in the ecosystem. This species preferentially nodulated with *Acacia* species over *Phaseolus vulgaris*. However, a rare member of the soil community, representing a novel *Rhizobium* lineage, was the dominant occupant of bean nodules and most of the genotypes found were specialists. A *nodC* phylogeny revealed that symbiovar mimosae is the most abundant in the sampled *R. etli* population. The *nodC* gene was detected in only 20% (n=40) of the *R. etli* root-surface isolates. This is the largest inventory of *Rhizobiaceae* species reported to date for a single region.

Derived from our findings, our exploration of nodule isolates was extended to other ecosystems in the state of Morelos, to sites with contrasting pH values and land-use, in order to understand the factors of soil and host that affect the distribution and diversity of rhizobia in this habitat. Different cultivars of beans and several mimosoid legumes species were used as hosts, using as inoculum soils of Morelos and an intensive agricultural site of bean in Guanajuato were used.

As result of this part, the SDTF is the ecosystem with higher diversity of nodule rhizobia (15 species) and dominated only *R. etli* and *Rhizobium* sp1. In the pine-oak forest (POF), *R. leucaenae* and *R. leguminosarum*-like lineages were the most recovered, with differences in their distribution due to the soil pH, while in alkaline soils the most abundant species were *Sinorhizobium americanum*. In the intensive agricultural site in Guanajuato *R. phaseoli* dominated. Four symbiotic allele clades were identified in the sampled sites: The mimosae in the SDTF, tropici in SDTF and POF, mediterranense in alkaline soils and the phaseoli symbiovar was found in Guanajuato (in all *R. phaseoli* isolates) and POF (*R. leguminosarum*-like isolates). The results of this thesis are discussed in light of legume-*Rhizobium* mutualism theory and recent findings in microbial community ecology and plant-root microbiome assembly.

IV. Agradecimientos

a. Financiamiento

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mientras estuve en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Y fue financiado por la beca concedida a mí persona por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México). Así mismo recibí apoyos para asistir a congresos por parte del programa PAEP-UNAM. Mi asesor principal, el Dr. Pablo Vinuesa recibió apoyo para este proyecto por parte del CONACyT (P1-60071 y 179133).

b. Personales

Gracias a mis padres y a mis hermanos, por ser mi guía y por su apoyo incondicional en las buenas, en las malas y en las peores. Por siempre sacarme una sonrisa y estar junto a mí siempre. No cabe duda de que sin ustedes, nada de esto sería posible.

A Laura Cervantes y Susana Brom, por ser mis amigas y confidentes. Por compartir alegrías, preocupaciones, tristeza y una que otra travesura. El cariño y gratitud que les tengo es muy grande y honesto. Gracias por formar parte de mi vida. También a David “el oso”, por su apoyo, las risas y por sus pláticas con efecto tranquilizante.

A Alfonso Felipe, por acompañarme en los ratos difíciles de esta última etapa. Por consentirme y alegrarme los días.

Al “profe” Vinuesa, por todo su apoyo y enseñanzas en lo académico. Por recibirme en su grupo, por su confianza y por motivarme a desarrollar mis capacidades. Por ponerme retos con la finalidad de crecer y por las muchas horas de discusión.

Al “profe” Alex, por ser mi vecino en el laboratorio desde el principio, por su amabilidad y calidez. Por dejarme colaborar con él y con Ciro, mi amigo y compañero desde hace más de 10 años. A Eunice por todo el cariño y los buenos momentos. A todos mis compañeros de laboratorio y a mis amigos dentro y fuera del CCG, que con su presencia, hicieron el tiempo más ameno, con o sin cervezas.

Por último, quiero dedicar esta tesis a la sociedad mexicana, que con sus impuestos hace posible que personas como yo hagamos esto que nos llena el alma. Hoy vivimos tiempos difíciles, de letargo y de desesperanza, espero que pronto mi país pueda dejar de sangrar y despertar, así como también espero poder redistribuir aunque sea un poco todo lo que me ha dado.

"Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas pequeñas, puede cambiar el mundo".

Eduardo Galeano.

"To raise new questions, new possibilities, to regard old problems from a new angle, requires creative imagination and marks real advance in science."

Albert Einstein

1. Introducción

1.1 *Ecología molecular de los rizobios y su interacción con plantas leguminosas*

Los rizobios son bacterias que comprenden a un grupo polifilético de α - y β -Proteobacterias. Son habitantes de diversos tipos de suelos y sedimentos y forman parte del microbioma de diferentes órganos y tejidos de plantas (Tan et al., 2001; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004; Berge et al., 2009; Ji et al., 2010; López-López et al., 2010; Brown et al., 2012; Mora et al., 2014).

El término simbiosis fue originalmente propuesto por de Bary en 1879 como “la vida conjunta de diferentes organismos” (Relman, 2008). Sin embargo existen otros conceptos donde se implica la vida conjunta de organismos, por ejemplo, el mutualismo es un término que se ha usado como sinónimo de simbiosis y en él ambos organismos se benefician. En el comensalismo uno de los organismos se beneficia del otro mientras que este no se ve afectado. Por otro lado, en el parasitismo uno de los organismos se beneficia a expensas y en detrimento del otro compañero de la relación (Martin y Schwab, 2013). En el presente trabajo, se manejará el término simbiosis como sinónimo de mutualismo.

La mayoría de los rizobios son organismos de vida libre que facultativamente pueden establecer una relación simbiótica con leguminosas hospederas y como producto de esa relación tiene lugar la fijación biológica de nitrógeno (FBN). La FBN se da en órganos especializados en raíces (o tallos) llamados nódulos. El nódulo provee un ambiente fisiológico propicio para que ocurra la FBN, la cual es llevada a cabo por rizobios intracelulares (Terpolilli et al., 2012). La enzima responsable de este proceso es la nitrogenasa (Zehr et al., 2003), que cataliza la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a una forma asimilable (amonio, NH_3). En la simbiosis rizobio-leguminosa la planta se beneficia del nitrógeno fijado (NH_3), el cual promueve su crecimiento mientras que la bacteria recibe nutrientes como carbohidratos derivados de la fotosíntesis y ácidos dicarboxílicos (Lodwig y Poole, 2003), además de recibir la protección del nódulo (van Rhijn y Vanderleyden, 1995). En nódulos inefectivos, donde no hay fijación de nitrógeno, los rizobios siguen recibiendo los nutrientes, condición que se consideraría parasítica (Denison y Kiers, 2004).

Antes de la revolución industrial y del desarrollo del proceso de Haber-Bosch, la única fuente de nitrógeno disponible en la Tierra era la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Esta es realizada por diversos grupos filogenéticos de bacterias y arqueas (Zehr et al., 2003). La FBN puede darse en vida libre o en simbiosis (Reed et al., 2011). El impacto global de la FBN se ha calculado que va desde 44 a 110 toneladas de nitrógeno por año (Galloway et al., 2004; Vitousek et al., 2013). La contribución del N fijado en simbiosis es de más del 50% de toda la BFN (Zahran, 1999) e incluso, en algunos ambientes la fijación de N en simbiosis aporta en ciertos ambientes no agrícolas más de 150 kg N/ha/año (Cleveland et al., 1999; Reed et al., 2011).

1.2 Mecanismos de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa

La interacción de los rizobios con plantas leguminosas está finamente regulada. Implica un proceso de infección en donde existe señalización molecular entre ambos simbioses durante todas sus etapas. Aunque existen varias excepciones (Giraud et al., 2007; Chaintreuil et al., 2013; Tsukui et al., 2013).

La interacción canónica comienza en la rizosfera donde los flavonoides contenidos en los exudados radicales inducen la síntesis del factor Nod por parte de los rizobios. La detección del factor Nod por parte de la leguminosa deriva en la elicitación del nódulo (Oldroyd, 2013). El intercambio de señales determina el rango de hospederos de los rizobios (Perret et al., 2000; Downie, 2010). El proceso comienza con la formación del hilo de infección seguido del acceso de los rizobios a las células corticales del nódulo en desarrollo, y culmina con la diferenciación del microsimbionte al estado fisiológico de bacteroide (Gage, 2004; Kondorosi et al., 2013).

Se requiere de un estricto control para la sincronización de la infección y el desarrollo de los nódulos (Madsen et al., 2010). Aunque es una área poco explorada, existe evidencia de que se requieren puntos de control para a) bloquear a patógenos potenciales (Soto et al., 2009), b) exista una selección temprana de rizobios eficientes y compatibles (Simms et al., 2006; Heath y Tiffin, 2009; Zanetti et al., 2010; Regus et al., 2014) y, c) se sancione a los microsimbiontes poco eficientes en etapas tardías de la interacción (Kiers y Denison, 2008; Marco et al., 2009; Akcay y Simms, 2011). A pesar de estos puntos de control, se ha reportado la existencia de rizobios poco eficientes “cheaters” (tramposos) que pueden estar en co-infección con rizobios efectivos dentro del nódulo (Sachs et al., 2010a; Sachs et al., 2010b).

Los rizobios son adquiridos del suelo por la leguminosa como parte de la microbiota asociada a la rizosfera y posiblemente también de bacterias fuertemente adheridas a las semillas (Mora et al., 2014) e incluso de endófitos de las mismas (López-López et al., 2010). Cada planta hospedera puede albergar en sus nódulos a diferentes genotipos rizobianos. Estas interacciones complejas genotipo-genotipo determinan la eficiencia en la fijación de N de la interacción planta-rizobio (Thrall et al., 2011; Terpolilli et al., 2012) , así como la aptitud y adecuación de la simbiosis (fitness) (Akçay y Simms, 2011; Barret et al., 2012; Heath y Stinchcombe, 2013; Porter y Simms, 2014). También la diversidad de las comunidades de rizobios se ve afectada por los continuos intercambios que existen entre las plantas y el suelo (Bever et al., 2012; Bever et al., 2013), determinando la estabilidad o disrupción de la simbiosis (Heath y Tiffin, 2009; Sachs et al., 2010a; Heath y Stinchcombe, 2013).

1.3 La familia Leguminosae

La familia *Leguminosae* es la tercera más grande entre las angiospermas, con más de 19,320 especies (Lewis, 2005). A pesar de su amplia distribución, las leguminosas son más diversas en las regiones tropicales y subtropicales que en las regiones templadas (Crews, 1999). Las leguminosas se dividen en tres subfamilias *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* y *Mimosoideae* (Sprent, 2001).

La mayor parte de las especies de *Leguminosae* forman asociaciones simbióticas con rizobios. Cerca del 23% de las especies exploradas de la subfamilia: *Caesalpinioideae*, 90% de las *Mimosoideae* y el 97% de las *Papilionoideae* establecen simbiosis con rizobios (Sprent, 1995).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*, familia *Papilionoideae*) es cultivado ampliamente en México, Centro y Sudamérica. Es una fuente importante de proteína para consumo humano (Broughton et al., 2003). Mesoamérica es el centro de origen del frijol común y su domesticación también ocurrió en diferentes puntos de los Andes (Gepts, 1988; Bitocchi et al., 2012; Bitocchi et al., 2013). El área de domesticación de *P. vulgaris* en Mesoamérica está tentativamente localizada en la zona del centro-oeste de México, en los estados de Jalisco y Guanajuato (Gepts, 1988), aunque también se ha situado en Oaxaca (Bitocchi et al., 2013). Por otro lado, poblaciones silvestres de otros estados de México como Chiapas, están ampliamente diferenciadas de las poblaciones del centro del país (Papa y Gepts, 2003; Papa et al., 2005).

El género *Acacia* es el segundo más grande de la familia *Leguminosae* (Después de *Astragalus*), con 1450 especies identificadas y es el más abundante dentro de las leguminosas mimosoides (Lewis, 2005). Se ha considerado polifilético (Miller y Bayer, 2001) y se ha propuesto su separación en cinco géneros distintos. Actualmente se reconocen tres subgéneros: *Acacia*, *Aculeiferum* y *Phyllodineae* (Maslin et al., 2003). El género *Acacia* es pantropical con más de 940 especies nativas de Australia. También está presente en África (>140 especies), Asia (>60 especies) y América (>180 especies). Las especies de este género se han reconocido por ser importantes en la recuperación de sitios agrícolas degradados y abandonados debido a su capacidad de mejorar las propiedades del suelo (Midgley y Bond, 2001). En México se han encontrado 84 especies nativas, de las cuales 34 son endémicas de este género (Rico-Arce, 2001). Un ejemplo es *A. farnesiana*, la cual está ampliamente distribuida en el país. Por otro lado, en la Selva Baja Caducifolia (SBC) de la Sierra de Huautla en el estado de Morelos, la cual es rica en leguminosas mimosoides, también se encuentran especies como *A. cochliacantha*, *A. coulteri*, *A. picachensis*, *A. riparia*, *A. pennatula*, *A. macilenta* y *A. bilimekii* (Dorado et al., 2005a; Dorado et al., 2005b).

1.3.1 Definición de hábitat y nicho

Un hábitat es un lugar específico ocupado por organismos para llevar a cabo su crecimiento y reproducción. Los órganos de las plantas, que son colonizados por comunidades microbianas con una estructura filogenéticamente diferenciada representan diferentes hábitats.

El nicho de una especie se define como la totalidad de los factores biológicos y ambientales que afectan a las especies en un hábitat, y esto incluye cómo las especies hacen uso de su ambiente (Vandermeer, 1972). Si bien el término nicho comprende un nivel de complejidad mayor, y en él se circunscribe de mejor manera la ecología de las comunidades microbianas que colonizan la raíz, para fines de este manuscrito usaremos únicamente el término hábitat.

1.3.2 Definición de rizosfera y rizoplano

El término rizosfera fue descrito por Hiltner en 1904 (Hartmann et al., 2008) y se ha definido como la zona de influencia de la raíz. Se trata del volumen de suelo alrededor de la superficie de la raíz y generalmente se refiere a 1-7 mm. Está compuesta por el

suelo, la raíz y el rizoplasma, que es la superficie de la raíz y las partículas adheridas a ésta. La rizosfera está colonizada por bacterias, hongos, protistas y nemátodos (Barea et al., 2005).

El efecto rizosférico es el enriquecimiento de poblaciones microbianas específicas en la interfaz suelo-raíz. Esto se logra en parte porque las raíces excretan al suelo diversos compuestos orgánicos (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, péptidos, enzimas, compuestos fenólicos, fotosideróforos y metabolitos secundarios) denominados exudados (Dakora y Phillips, 2002; Walker et al., 2003). A este proceso se le conoce como rizodeposición. En este proceso también se liberan poblaciones de células especializadas de la raíz al suelo (células de la cofia, “root cap border cells”) (Dennis et al., 2010). Se ha propuesto que contribuyen de forma significativa al efecto rizosférico debido a que esta población celular permanece viva después de su descamación de la raíz (Vermeer y McCully, 1982; Hawes et al., 2000). Los exudados (o rizodepósitos) generados desde la punta de las raíces y la rizodermis provocan un cambio “shift” en la biota del suelo (Bulgarelli et al., 2013).

La comunidad microbiana usa y transforma a los nutrientes excretados por la raíz, estableciendo un recambio de la materia orgánica y el reciclaje de los compuestos que están presentes en la rizosfera (Bulgarelli et al., 2013; López-Guerrero et al., 2013). Además, en los exudados hay moléculas como los flavonoides que sirven como señales para que se den interacciones simbióticas entre la planta y la microbiota de la rizosfera, como la fijación biológica de nitrógeno (Oldroyd, 2013).

1.3.3 Modelo multipasos de adquisición y diferenciación de la microbiota de la raíz

Como se describió en la sección anterior, la rizodeposición alimenta un proceso inicial dirigido por los sustratos que se liberan (Bulgarelli et al., 2013). En él, las comunidades cambiarán y comenzarán a diferenciarse de forma transitoria según los nutrientes existentes (López-Guerrero et al., 2013), lo cual convergerá en un proceso de ajuste fino dependiente del genotipo del hospedero (la planta), estableciendo una red compleja y coordinada de señalización entre la raíz y las comunidades microbianas. A este proceso de adquisición de microbiota de la raíz se le conoce como “modelo multipasos”. Como resultado, se selecciona a la comunidad cercana y endófito de la raíz. En un estudio reciente con arroz se incluye el hábitat del rizoplasma en el modelo

como plataforma de selección y reclutamiento de las comunidades microbianas de la raíz (Edwards et al., 2015). Sus resultados demuestran una estructura y ensamble diferente a lo largo de los tres hábitats explorados (rizosfera, rizoplano y endosfera). De igual forma se ha demostrado el mismo efecto de selección por pasos de las comunidades en otros modelos como *Zea mays* (Peiffer et al., 2013), *Arabidopsis* spp. (Schlaeppli et al., 2014) y *Populus deltoides* (Gottel et al., 2011).

1.4 Los rizobios presentan diferentes estilos de vida

Los rizobios están presentes en diferentes hábitats y ambientes, incluyendo los no relacionados con la fijación biológica del nitrógeno en leguminosas (ver tema 1.1). Las estimas de diversidad de rizobios se han basado principalmente en el análisis de bacterias aisladas de los nódulos. Pocos estudios han explorado la diversidad en la rizosfera de leguminosas (Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009) o directamente en suelos agrícolas (Louvrier et al., 1996; Sullivan et al., 1996). En estos trabajos las estimas se hicieron con técnicas dependientes de cultivo, aunque también hay algunos trabajos que reportan estimas de diversidad con aproximaciones independientes del aislamiento microbiano (Zézé et al., 2001; Sarita et al., 2005).

Se ha sugerido que la diversidad de las comunidades rizobianas que no están en nódulos es mayor a la que existe al interior de ellos. De hecho, se ha descrito que las poblaciones al interior de los nódulos presentan frecuentemente una estructura clonal y epidémica, es decir, con unos pocos genotipos mostrando una fuerte dominancia numérica (Silva et al., 1999; Vinuesa et al., 2005a).

A los rizobios se les reconocen roles ecológicos como promotores del crecimiento vegetal, ya sea como endófitos de plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004; López-López et al., 2010) o como saprófitos del suelo (Sullivan et al., 1996; Alami et al., 2000). También pueden tener un papel como parásitos (Bourras et al., 2015; Regus et al., 2015). Los rizobios tienen muchos estilos de vida, pero existe una visión sesgada de su cantidad, riqueza y estructura en el suelo, ya que por mucho tiempo los estudios ecológicos se han centrado en su capacidad simbiótica.

1.5 Factores asociados a la distribución de microorganismos en el suelo

Los microorganismos son tal vez, los seres vivos más diversos y abundantes del planeta (Torsvik et al., 2002; Venter et al., 2004). El estudio de su distribución biogeográfica ha sido de interés para el entendimiento de dicha riqueza y abundancia. Hasta hace una década había prevalecido la idea de que “Todo está en todas partes, pero, el ambiente selecciona” (De Wit y Bouvier, 2006), pero no existían muchos estudios que demostraran lo que predijo Baas Becking en 1934 o que identificaran aquellos factores del ambiente que eran responsables de la selección y distribución de los microorganismos, más allá del aislamiento geográfico (Horner-Devine et al., 2004; Papke y Ward, 2004). En años recientes, el pH ha sido ampliamente reconocido como uno de los factores más influyentes en la distribución microbiana a gran escala (Fierer y Jackson, 2006; Diouf et al., 2007; Lauber et al., 2009).

Como se menciona en la sección 1.4, las plantas son determinantes importantes en la selección de microorganismos que están próximos a sus raíces. En un primer nivel de análisis se ha observado que existe una diferente estructura y composición de las comunidades microbianas a lo largo de los hábitats muestreados (rizosfera, rizoplano y endosfera) (Uroz et al., 2010; Edwards et al., 2015). Por otro lado, entre hábitats, las diferencias observadas se deben principalmente a factores ambientales y fisicoquímicos, como pH (Gottel et al., 2011) y zonas climáticas (Peiffer et al., 2013). Estudiando a las comunidades de los diferentes hábitats de la raíz (suelo y rizosfera) de diferentes especies cercanas a *Arabidopsis thaliana*, se observaron como mayores factores de discriminación el tipo de suelo y las condiciones de crecimiento (invernadero y campo) que entre los hábitats de la raíz (Schlaeppli et al., 2014). En estos trabajos no se han observado diferencias claras asociadas al tipo de planta, lo cual puede deberse a que los factores ambientales al ser contrastantes, ejercen una mayor influencia en las comunidades asociadas a los diferentes hábitats de la raíz. Se puede hipotetizar que a una escala geográfica menor donde no hay diferencias marcadas en las propiedades ambientales y fisicoquímicas del suelo. Factores como la vegetación, la disponibilidad de fuentes de carbono y otros nutrientes, así como la humedad del suelo, pueden influir en la composición y estructura de las comunidades microbianas.

1.6 Factores asociados a la distribución de rizobios

La distribución de rizobios simbióticos ha sido ampliamente estudiada en diferentes tipos de suelos, principalmente en suelos agrícolas con diferentes propiedades fisicoquímicas (Brockwell et al., 1995; McInnes et al., 2004; Slattery et al., 2004). Aunque se ha explorado poco la ecología de los rizobios no-simbióticos, se ha reconocido su abundancia y diversidad en suelos (Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009; VanInsberghe et al., 2015).

Como simbioses, factores como el pH, la salinidad y el tipo de ecosistema influyen en su distribución en los nódulos de leguminosas (Vargas y Graham, 1988; Anyango et al., 1995; Verástegui-Valdés et al., 2014). Se ha demostrado la dominancia en nódulos de frijol de *R. tropici* en suelos con pH ácido y altas temperaturas (Vargas y Graham, 1988; Anyango et al., 1995), mientras que en suelos alcalinos, las especies del género *Sinorhizobium* son más abundantes (Mhamdi et al., 2002; Zurdo-Piñeiro et al., 2009; Mnasri et al., 2012). En el caso de la soya (*Glycine max*), también se ha demostrado que el pH es un factor importante en la selección de los simbioses, *Sinorhizobium* domina en condiciones alcalinas, mientras que en condiciones neutras abundan las cepas de *Bradyrhizobium* (Han et al., 2009; Zhang et al., 2011).

1.7 Especies de rizobios simbioses de *Phaseolus vulgaris*

En total se han reportado 15 especies del género *Rhizobium* que nodulan al frijol: *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum*, *R. giardinii* (Amarger et al., 1997), *R. leguminosarum* (García-Fraile et al., 2010), *R. lusitanum* (Valverde et al., 2006), *R. phaseoli* (Ramírez-Bahena et al., 2008), *R. vallis* (Wang et al., 2011), *R. leucaenae* (Ribeiro et al., 2013), *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. mesoamericanum* (López-López et al., 2012), *R. freirei* (Dall'Agnol et al., 2013) y *R. azibenze* (Mnasri et al., 2014). Del género *Sinorhizobium* (*Ensifer*) se han recuperado las siguientes especies de nódulos de frijol: *Sinorhizobium meliloti* (Zurdo-Piñeiro et al., 2009), *S. americanum* (Mnasri et al., 2012; Verástegui-Valdés et al., 2014), *S. saheli* y *S. teranga* (Aguilar et al., 2001). *Mesorhizobium loti* también se ha encontrado como simbioses del frijol (Aguilar et al., 2001). Además se han reportado cepas del género *Bradyrhizobium* capaces de nodular a esta leguminosa en China (Han et al., 2005). Cabe aclarar que muchas especies se han aislado de otras leguminosas y también son capaces de formar nódulos en el frijol, como *R. mongolense* –*R. gallicum sensu lato*– (van Berkum et al., 1998; Silva et al., 2005) y *R. oryzae* (Peng et al., 2008). También se ha reportado que potenciales

fitopatógenos como *A. tumefaciens* (Martínez et al., 1987; Aserse et al., 2012), *A. radiobacter* (Aserse et al., 2012) y *R. rhizogenes* (Velázquez et al., 2005) son capaces de formar nódulos efectivos en *P. vulgaris*.

Debido a esta gran diversidad de especies capaces de nodular a esta leguminosa, se ha considerado promiscua. En estudios de comunidades de rizobios en varias leguminosas se ha estimado que aproximadamente el 30% de los nódulos son ocupados por una sola especie, mientras que aproximadamente el 75% está ocupado por especies recuperadas en bajo en número (McInnes et al., 2004). La especie dominante puede estar determinada por factores edáficos, de adecuación o de eficiencia en la simbiosis, como los mencionados en la sección anterior.

1.8 Simbiovariedades asociadas a la nodulación en frijol

El término simbiovar se refiere a la variante ecotípica de una especie de rizobio capaz de nodular un tipo determinado de leguminosa. Se utiliza para distinguir grupos de rango de hospederos distintos dentro de una misma especie rizobiana (Rogel et al., 2011). Por ejemplo, se han descrito dos simbiovariedades en la especie *R. etli*: *mimosae* y *phaseoli*. La primera es capaz de nodular a leguminosas mimosoides y al frijol, mientras que la segunda sólo es capaz de hacerlo con frijol (Wang et al., 1999). La asignación de una simbiovar a cepas de rizobios tiene que estar basada en las capacidades simbióticas en leguminosas, además de poseer diferencias en su rango de hospedero, las cuales deben de estar soportadas por información de secuencia de los genes simbióticos (Rogel et al., 2011).

Se cree que los rizobios que nodulan al frijol, han adquirido su capacidad simbiótica a través de transferencia horizontal de genes de *R. etli* relacionados con la fijación de nitrógeno y la formación de nódulo, y que en su conjunto los genes de simbiosis con frijol forman un grupo filogenético cercano (Velázquez et al., 2005; Rogel et al., 2011; Mnasri et al., 2012) dando lugar a la simbiovar *phaseoli*.

Por la secuencia del gen *nodC* (gen codificante para la quitin sintetasa necesaria para la síntesis del factor Nod, véase sección 1.2) la simbiovar *phaseoli* es filogenéticamente cercana a la mediterránea, *gallicum*, *giardinii* y *mimosae* (Rogel et al., 2011), lo cual sugiere que tuvieron un origen común pero evolucionaron de forma independiente. Sin embargo, los genes simbióticos de la simbiovar *tropici* (Ormeno-Orrillo et al., 2012b) no

son tan próximos filogenéticamente, lo cual implicaría otro posible origen análogo para la formación de nódulos en frijol. De la misma forma, se ha sugerido que el origen de la simbiosis del frijol tiene como origen el continente americano (Herrera-Cervera et al., 1999; Valverde et al., 2011) y que su diseminación a otras partes del mundo se debe posiblemente a la introducción de la leguminosa en otras regiones a través de semillas (Pérez-Ramírez et al., 1998) y a la adopción de las comunidades rizobianas nativas, mediante transferencia horizontal de los genes simbióticos, los cuales posteriormente evolucionaron independientemente por aislamiento geográfico.

1.9 Distribución de rizobios asociados al frijol en México

En México las especies que nodulan al frijol son *R. etli*, *R. phaseoli* (Segovia et al., 1993; López-Guerrero et al., 2012), *R. gallicum* (Silva et al., 2003), *R. mesoamericanum* (López-López et al., 2012), *R. leucaenae* (Ribeiro et al., 2012), *Sinorhizobium americanum* y *R. leguminosarum* (Verástegui-Valdés et al., 2014). Se ha propuesto que el centro de origen de una leguminosa también es el centro de diversificación de los rizobios asociados a ella (Martínez-Romero, 2009), por lo que cabe esperar que en los centros de origen haya una alta diversidad de sus rizobios simbióticos. Sin embargo, en México se ha centrado el estudio de los rizobios a pocas regiones agro-ecológicas mediante el uso de plantas trampa, usando pocas variedades de frijol.

1.10 Simbiontes de las leguminosas del género Acacia y su distribución en México

La mayoría de los microsimbiontes del género *Acacia* están clasificados dentro de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* (de Lajudie et al., 1998; Lafay y Burdon, 1998; Marsudi et al., 1999; Nick et al., 1999; Toledo et al., 2003; Wang et al., 2003).

Hay una amplia diversidad de simbiontes de éste género en cuanto al rango de hospederos, eficiencia simbiótica y origen geográfico. En la mayoría de los casos las acacias pueden establecer simbiosis tanto con rizobios de crecimiento rápido (*Rhizobium* spp. o *Sinorhizobium* spp.), como de lento (*Bradyrhizobium*), pero sólo puede desarrollar una simbiosis efectiva con algún tipo (Njiti y Galiana, 1996; Räsänen et al., 2001).

Se ha propuesto que leguminosas mimosoides que pertenecen a los géneros *Acacia*, *Prosopis* y *Leucaena* pertenecen al mismo grupo de nodulación en base a pruebas realizadas con una colección de rizobios aislados de *A. senegal* y *Prosopis chilensis* en Senegal (Zhang et al., 1991). Mediante experimentos de nodulación cruzada, se mostró que estos aislados tienen la capacidad de nodular con esas leguminosas. Actualmente esas cepas están clasificadas como *S. arboris* y *S. kostiense* (Nick et al., 1999). También se han descrito *S. teranga*, *S. saheli* y *M. plurifarum* como simbioses de acacias en África (De Lajudie et al., 1994; De Lajudie et al., 1998). Se ha observado que las especies de acacias de amplia distribución tienen una gran diversidad de rizobios simbioses asociados en comparación con aquellas que son de distribución restringida (Thrall et al., 2000).

Aunque la mayoría de las especies simbioses del género *Acacia* se han descrito en África, también pueden nodular eficientemente con especies americanas (Haukka et al., 1998; Räsänen et al., 2001), se han aislado cepas nativas de México capaces de nodular con varias especies de acacias nativas como *S. americanum* (Toledo et al., 2003) y *M. plurifarum* aislada de *Leucaena leucocephala* (Wang et al., 2003). Esto sugiere que las cepas de *S. americanum* encontradas en México pertenecen al grupo de nodulación Acacia-Prosopis-Leucaena reportado para las cepas africanas (Toledo et al., 2003), aunque hay diferencias claras en los genes de nodulación *nodA* y *nifH* entre las cepas africanas y americanas de *Sinorhizobium*. Caso contrario con lo reportado para las cepas geográficamente distintas del género *Mesorhizobium*, donde los genes simbióticos *nodA* y *nifH* son idénticos (Haukka et al., 1998; Räsänen et al., 2001).

1.11 El estado de Morelos como escenario para el estudio de la ecología y diversidad de los rizobios

La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla (REBIOSH), esta localizada al sur del estado de Morelos. El ecosistema característico de la reserva es la Selva Baja Caducifolia (SBC), la cual es megadiversa y se encuentra fuertemente amenazada debido a la sobre-explotación de su bosque y a la lenta recuperación del mismo debido a su marcada estacionalidad (Janzen, 1988). En los meses de junio a septiembre luce verde y abundante, mientras que en temporada de secas (octubre-mayo) la vegetación pierde sus hojas y llueve poco (<100mm de precipitación). Otra

característica es que los árboles presentes en la SBC no rebasan los 12m de altura (Dorado et al., 2005b). La flora dominante pertenece a las familias *Leguminosae* y *Bignoniaceae*, las cuales forman un dosel cerrado. También son comunes especies suculentas y es pobre en especies de pastos. (Pennington et al., 2009; Linares-Palomino et al., 2011).

La REBIOSH está dominada por una gran variedad de árboles y arbustos de la subfamilia *Mimosoidae*, que incluye especies de los géneros *Acacia* spp., *Lysiloma* spp., y *Mimosa* spp., por mencionar algunos, pero están presentes las tres subfamilias de *Leguminosae* (Dorado et al., 2005a; Bruneau et al., 2013). La REBIOSH protege el remanente más grande de SBC en Morelos (Dorado et al., 2005a), el cual comprende un mosaico de bosque primario y secundario, rodeado de terrenos de uso agrícola y pequeños poblados que subsisten del cultivo de baja intensidad en la zona (Martínez-Garza et al., 2011).

La SBC es el ecosistema más extendido y dominante de Morelos y es característico del 87% del estado, aunque en la zona norte montañosa hay vegetación primaria de bosque templado, tanto de pino como de pino-encino, y algunas asociaciones de latifoliadas. El estado de Morelos posee diferentes ecosistemas y diferentes climas, desde fríos sub-húmedos a cálidos. Tiene suelos con diferentes pH's y abundancias variables de leguminosas. Ello hace del estado un escenario propicio para estudiar la diversidad de rizobios a través de sus diferentes ecosistemas, diferentes hospederos y zonas agro-ecológicas.

1.12 Aproximaciones metodológicas para el estudio de la diversidad de los rizobios considerando sus diferentes estilos de vida

Para el estudio de la diversidad de los rizobios se han empleado diferentes aproximaciones y técnicas con las cuales se ha logrado elucidar la abundancia y riqueza de los rizobios. Sin embargo, las metodologías tienen diferentes limitaciones y poder de resolución a nivel taxonómico.

Por muchos años, los esfuerzos para el estudio de la diversidad y estructura de las comunidades de rizobios se han centrado en su aislamiento a partir de nódulos de diversas leguminosas cultivadas y nativas en diferentes regiones del mundo (Wang et al., 1999; Carelli et al., 2000; Li et al., 2012). Otra forma de estudio, ha sido

inoculando semillas germinadas en el laboratorio con muestras de suelo y creciéndolas en condiciones de invernadero, en estos métodos, las leguminosas actúan como plantas trampa de rizobios, para posteriormente, caracterizar a los recuperados de nódulo (Herrera-Cervera et al., 1999)(Fig. T1).

Las técnicas y métodos moleculares de caracterización de rizobios en un inicio consistían en medir la movilidad electroforética de enzimas (MLEE, Multi-loci Enzyme Electrophoresis), para clasificar a los aislados y estimar la diversidad genética (Piñero et al., 1988; Souza et al., 1994). Otras técnicas que se han empleado han sido los RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) de genes ribosomales (rRNA) y de espaciadores intergénicos (Vinuesa et al., 1998; Tan et al., 2001), también por perfiles del genoma completo mediante AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Feng, 2000; Terefework et al., 2001), por la amplificación de elementos repetidos en el genoma (rep-PCR) (Vinuesa et al., 2005a) y por RAPD's (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Moschetti et al., 2005; Stefan et al., 2015). Actualmente se usa ampliamente el análisis multilocus de secuencias de genes del core genómico (MLSA) (Vinuesa et al., 2005b; Ribeiro et al., 2009).

Los marcadores moleculares, en general proveen mayor información que los atributos fenotípicos debido al poder de resolución que poseen, ya que se puede tener una aproximación razonablemente cercana de la filogenia de especies, dependiendo del o los marcadores empleados (Turner y Young, 2000; Gaunt et al., 2001; Vinuesa et al., 2005b).

El uso del marcador 16S rRNA ha aportado mucha información sobre la diversidad bacteriana en el planeta (Sogin et al., 2006; Lynch y Neufeld, 2015), sin embargo, en el caso de los rizobios, pierde resolución a nivel de especies (Vinuesa et al., 2005a), aunado a que se ha demostrado la presencia de duplicaciones en elementos extracromosomales (Acinas et al., 2004; Harrison et al., 2010) y a la capacidad que tienen de ser transferidos horizontalmente (Sullivan et al., 1996; Terefework et al., 1998).

La amplificación y secuenciación de diversos marcadores cromosomales es de uso común en el estudio de la diversidad de los rizobios y en la descripción de nuevas especies. Se recomienda que en la descripción de una especie nueva se tomen en

cuenta al menos tres marcadores (Tindall et al., 2010), pero, en la práctica, no siempre se reportan los tres o los mismos en los diferentes estudios.

El uso de técnicas dependientes de cultivo, genera en sí un sesgo en la estima de la diversidad, ya que está condicionada al medio de cultivo empleado y a las características fenotípicas, como la morfología colonial, la resistencia a ciertos antibióticos, a los nutrientes y a las condiciones de esta estrategia. Por otro lado, en el uso de plantas trampa se han observado diferencias en la diversidad de rizobios recuperada debido a la cantidad de inóculo empleado y el tipo de suelo (Bala et al., 2001). La mayor parte de los trabajos utilizan pocas variedades cultivadas de las leguminosas de interés (Souza et al., 1994) y se ha explorado poco la diversidad de simbiontes de leguminosas silvestres (Acosta-Duran y Martínez-Romero, 2002; Wang et al., 2006; López-López et al., 2012).

El uso de plantas trampa solo permite recuperar a aquellos rizobios simbióticos capaces de formar nódulos con la leguminosa en cuestión y se pierden a todos los rizobios simbióticos que por competencia, compatibilidad o por número no nodulan a la planta trampa (Fig. T1), aún pudiendo hacerlo cuando se inoculan como cepas puras. Como se menciona en los apartados 1.5 y 1.6 también factores fisicoquímicos del suelo como el pH o el tipo de suelo pueden afectar qué especie de rizobio es capaz de establecer una relación simbiótica con las leguminosas (Vargas y Graham, 1988; Verástegui-Valdés et al., 2014).

Para la búsqueda de rizobios que están asociados a las raíces de leguminosas, mediante técnicas microbiológicas, es importante considerar que en el suelo hay una gran diversidad y abundancia de muchos microorganismos, por lo que el diseño experimental tiene que contemplar medios de cultivo con cierto poder de diferenciación o selección (Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009), así como una validación molecular por la presencia de algún marcador cromosomal (Turner y Young, 2000).

Para el estudio de la diversidad de los rizobios que habitan los suelos también es conveniente incorporar estrategias que no dependan del aislamiento de bacterias, ya que como se ha mencionado, los medios de cultivo y condiciones de crecimiento presentan sesgos inherentes a la estrategia. La aproximación independiente de cultivo es útil para evitar los sesgos del aislamiento y obtener información de los

oligonucleótidos linaje-específicos para seleccionar las secuencias del grupo bacteriano de interés, para lo cual, el diseño apropiado de ellos es crucial, ya que tienen que permitir variaciones al interior del grupo y pasar por un proceso de validación experimental con cepas de referencia (Rose et al., 2003; Contreras-Moreira et al., 2009).

En el proceso de amplificación de secuencias a partir de DNA metagenómico, es necesario minimizar los sesgos y artefactos inherentes a la PCR (Polymerase Chain Reaction), como la deriva de la PCR, y la formación de quimeras y heterodúplexes, los cuales podrían causar una distorsión de la diversidad que se observa en las muestras. Medidas como usar una polimerasa de la familia “hot-start” con actividad correctora, tener réplicas técnicas y biológicas, disminuir el número de ciclos y llevar a cabo una PCR de reacondicionamiento, pueden minimizar la presencia de sesgos y artefactos (Polz y Cavanaugh, 1998; Acinas et al., 2005).

Ya generadas las secuencias tras una clonación en un vector para ese fin como los de la familia TOPO-TA o bien, mediante la secuenciación masiva de los amplicones, las secuencias deben pasar por un proceso de filtrado por calidad así como la depuración de quimeras (Huber et al., 2004; Gonzalez et al., 2005).

2. Justificación del proyecto de doctorado

Los rizobios se pueden encontrar en suelos y sedimentos, y forman parte del microbioma de la raíz de órganos y tejidos de plantas, incluyendo aquellos que no corresponden a leguminosas (Tan et al., 2001; Ji et al., 2010; Brown et al., 2012; Mora et al., 2014). No obstante, el estudio de los rizobios, en general, se ha centrado en aislados de nódulos, por lo que se tiene un panorama sesgado y reducido de su diversidad y de sus genes simbióticos en el suelo, rizoplano y nódulo. Pocos trabajos previos han analizado la diversidad de los rizobios en las rizosferas de leguminosas (Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009), otros lo han hecho directamente en los suelos mediante el aislamiento bacteriano (Louvrier et al., 1996; Sullivan et al., 1996) o mediante aproximaciones independientes de cultivo (Zézé et al., 2001; Sarita et al., 2005). En ellos se ha sugerido que los rizobios rizosféricos son más diversos que los recuperados de los nódulos. De hecho, se ha descrito que las poblaciones al interior de los nódulos presentan frecuentemente una estructura clonal y epidémica, es decir, con unos pocos genotipos mostrando una fuerte dominancia numérica (Silva et al., 1999; McInnes et al., 2004; Vinuesa et al., 2005a). Sin embargo, existe un gran vacío en la Ecología y en la sistemática de los rizobios: no se sabe casi nada acerca de la diversidad, estructura y aspectos funcionales de los rizobios que están fuera del nódulo. Esto limita fuertemente nuestra capacidad de entendimiento de aspectos ecológicos como la competitividad por la ocupación del nódulo y los efectos del hospedero sobre la comunidad rizobiana del suelo.

Para el estudio de la diversidad de los rizobios propusimos el uso de una aproximación gen- y linaje-dirigida independiente de cultivo como estrategia complementaria a la recuperación de cepas de rizoplano y nódulo para la prospección de la diversidad de este grupo bacteriano. Se exploró la diversidad de los rizobios tomando en cuenta sus diferentes estilos de vida y se evaluó el efecto de selección del hospedero sobre la comunidad total de rizobios en una región con alta diversidad de leguminosas. Elegimos el ecosistema de SBC, donde son abundantes las leguminosas, especialmente las mimosoides. También se analizaron dos sitios agrícolas de uso tradicional, lo que permitió además, estudiar el efecto del manejo del suelo tanto en especies nativas de *Acacia* y variedades cultivadas de *Phaseolus vulgaris*.

Como resultado de lo anterior, consideramos que se aclaró un poco la ecología y la diversidad de los rizobios asociada al frijol y a las leguminosas mimosoides, así como la selección del hospedero sobre la comunidad total de rizobios del suelo. Además encontramos la dominancia de dos linajes de rizobios, *R. etli* sv. mimosae para hospederos del género *Acacia* y *Rhizobium* sp1. para las dos variedades cultivadas de frijol analizadas.

El frijol común es una leguminosa de gran importancia para el consumo humano en México, Centro y Sudamérica. Por su amplio número de simbiontes rizobianos, se le considera a esta leguminosa como promiscua. Por otro lado México se considera como uno de los centros de origen y diversificación del frijol, por lo que es rico en variedades silvestres y cultivadas. Sin embargo, por muchos años, *R. etli* se había considerado como el simbionte dominante del frijol en México (Segovia et al., 1993), aunque recientemente ha sufrido cambios taxonómicos (López-Guerrero et al., 2012). Si bien, se han encontrado otras cinco especies simbióticas para esta leguminosa en el país (Silva et al., 2003; López-López et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Verástegui-Valdés et al., 2014), se puede esperar que la diversidad de rizobios asociados al él sea mayor a la reportada hasta ahora. Por ello y por nuestros resultados en los suelos de SBC, fue pertinente hacer una ampliar nuestra exploración de los rizobios asociados al frijol, analizando factores condicionantes de su distribución y diversidad en suelos de diferentes ecosistemas con pH's y manejo de suelo contrastantes, para entender mejor su ecología y su diversidad en el país. Para lo cual incluimos un sitio agrícola intensivo en Guanajuato, estado donde se describió a la cepa tipo CFN42 de *R. etli* en nódulos de frijol -sv. phaseoli- (Piñero et al., 1988; Segovia et al., 1993). Lo anterior en conjunto con el análisis de genes simbióticos para también analizar la distribución de las simbiovariedades de las especies de rizobios de nódulo más abundantes.

3. Objetivo general

Analizar la selección de los rizobios ejercida por diversos hospederos a nivel de rizoplano y nódulo del repertorio de la familia *Rhizobiaceae* disponible en el suelo. Además se planteó estudiar los factores bióticos y fisicoquímicos selectos que afectan la diversidad de rizobios en nódulos y la distribución de las simbiovariedades asociadas a frijol y a leguminosas mimosoides.

3.1 Objetivos particulares

- a) Selección de un marcador cromosomal común bien documentado en bases de datos y útil para hacer prospecciones de diversidad de la familia *Rhizobiaceae*.
- b) Seleccionar un punto de corte adecuado de similitud para la definición de OTU para las estimas de diversidad.
- c) Evaluar experimentalmente la mayoría de los posibles sesgos introducidos en la selección de rizobios simbióticos de nódulo por la leguminosa hospedera en experimentos de trampeo en diversos suelos.
- d) Evaluar experimentalmente los posibles sesgos introducidos por la leguminosa y los medios de cultivo utilizados en el aislamiento de rizobios del rizoplano.
- e) Analizar secuencias *recA* de librerías de DNA metagenómico de suelos de SBC (uno conservado y dos agrícolas) y de aislados de rizobios de nódulos y rizoplano de diferentes variedades de frijol cultivadas y de leguminosas mimosoides y estimar la diversidad alfa de los diferentes compartimentos.
- f) Analizar el efecto del hospedero sobre las comunidades rizobianas de suelo y de rizoplano.
- g) Analizar al compartimento simbiótico de rizobios en diferentes variedades cultivadas de frijol y leguminosas mimosoides en suelos de diferentes ecosistemas y con diferentes pH del estado de Morelos y Guanajuato

4. Materiales y métodos

La lista de las cepas aisladas usadas en este estudio y sus orígenes (de hospedero y geográficos) están presentados en el trabajo publicado (sección 5.1.1) y en los apéndices 2 y 3 de esta tesis. Los principales métodos empleados se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos utilizados este estudio, artículos publicados de referencia y sección donde son descritos y/o empleados.

Método	Referencias Importantes	Sección de la tesis
Toma de muestras de suelo, localización y características fisicoquímicas.		5.1.1 y 6.1.2
Aislamiento de rizobios de rizoplasma y nódulo		
Experimentos de validación para experimentos de nodulación en campo y laboratorio.	(Vincent, 1970; Bala et al., 2001)	5.1.1
Experimentos de validación para el aislamiento de rizobios a partir de rizoplasma.	(Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009; Edwards et al., 2015)	5.1.1
Formulaciones de medios de cultivo empleados en este estudio	(Vincent, 1970; Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009)	Apéndice 1
Protocolo de aislamiento de rizobios de rizoplasma	(Segovia et al., 1991; Sachs et al., 2009)	5.1.1
Extracción de DNA genómico de aislados.	(Sambrook y Russell, 2001)	5.1.1, 6.1.2 y 6.1.3
Selección del marcador común para caracterizar a nivel de especies a los rizobios de suelo, rizoplasma y nódulos		
Selección del marcador <i>recA</i> para identificar a nivel de especies los aislados y construcción de librerías de DNA metagenómico.	(Gaunt et al., 2001; Rose et al., 2003; Vinuesa et al., 2005b; Vinuesa, 2010)	5.1.1 y 6.1.2
Oligonucleótidos		
Oligonucleótidos <i>recA</i> , <i>nodC</i> y <i>glnII</i> . Condiciones de amplificación por PCR.	(Turner y Young, 2000; Sarita et al., 2005; Vinuesa et al., 2005b)	5.1.1
Diseño de oligonucleótidos <i>recA</i> linaje-específicos y análisis de cobertura.	(Contreras-Moreira et al., 2009)	5.1.1
Construcción de librerías		
Extracción de DNA metagenómico a partir de suelo y post-purificación para eliminar inhibidores.	(Tsai y Olson, 1992; Moreira, 1998; Sagar et al., 2014)	5.1.1
Condiciones de PCR para amplificar <i>recA</i> a partir de DNA metagenómico. PCR de reacondicionamiento.	(Polz y Cavanaugh, 1998; Acinas et al., 2005)	5.1.1
Clonación en vector TOPO pCR4.0 y transformación en células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	(Sambrook y Russell, 2001)	5.1.1
Extracción de plásmidos en formato de placas de 96 pozos.	(Sambrook y Russell, 2001)	Apéndice 1
Filtración de secuencias por índices de calidad, depuración de quimeras y secuencias causantes de ramas largas.	(Ewing y Green, 1998; Ewing et al., 1998; Huber et al., 2004; Gonzalez et al., 2005; Schloss et al., 2009)	5.1.1
Análisis filogenético de las secuencias		

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis filogenético bajo la aproximación de máxima verosimilitud (ML).	(Guindon et al., 2009; Guindon et al., 2010)	5.1.1, 6.1.1–6.1.3
Estima de los patrones de diversidad alfa y beta de las comunidades de rizobios por hábitat y tipo de suelo.		
Elección del punto de corte al 94% de similitud para la definición de OTU.	(Lozupone y Knight, 2008; Schloss et al., 2009)	5.1.1 y 6.1.2
Estima de índices de parámetros de diversidad alfa	(Schloss et al., 2009)	5.1.1
Estima de parámetros de diversidad beta UNIFRAC ponderado y no ponderado.	(Lozupone y Knight, 2008; Schloss et al., 2009; Lozupone et al., 2010)	5.1.1
Análisis multivariado de la distribución de los linajes recuperados por hábitat y por hospedero		
Análisis de componentes principales (PCA).	(Borcard et al., 2011; Husson et al., 2014; Oksanen et al., 2014)	5.1.1 y 6.1.2
Clusterización jerárquica de los linajes distribuidos en las gráficas de PCA por hábitat y suelo.	(Husson et al., 2014)	5.1.1
Evaluación de la selección del hospedero y del suelo sobre los rizobios simbióticos		
Gráficas de mosaico.	(Meyer et al., 2014)	5.1.1, 6.1.2 y 6.1.3
Elaboración de gráficas de barras.	(Wickham, 2009)	5.1.1 y 6.1.3
Estima de la diversidad genética intraespecífica de <i>R.etli</i> y <i>Rhizobium</i> sp1. basada en secuencias <i>recA</i>		
Estima de número de haplotipos y diversidad nucleotídica por sitio.	(Librado y Rozas, 2009)	5.1.1 y 6.1.3
Cálculo de frecuencias de haplotipos	(Excoffier y Lischer, 2011)	5.1.1 y 6.1.3
Cálculo de Índice de diferenciación apareado (PDI) para medir especialización	(Dorman, 2011; Poisot et al., 2012)	5.1.1 y 6.1.3

*La sección 5.1.1 corresponde al trabajo publicado como producto de esta tesis de doctorado (Miranda-Sánchez et al., 2015)

5. Resultados

La sección 5.1.1 corresponde al trabajo publicado como producto de esta tesis de doctorado (Miranda-Sánchez et al., 2015).

5.1.1 Patrones de diversidad de las comunidades de la familia Rhizobiaceae que habitan suelo, rizoplano y nódulos revelan una fuerte selección de los rizobios por las leguminosas

Los rizobios prosperan en diferentes ambientes; sin embargo, las estimas actuales de su diversidad se basan principalmente en el análisis de los aislados de raíces de nódulos de leguminosas, mientras que las comunidades que viven en las superficies de las raíces y suelo han permanecido poco exploradas.

En este trabajo (Miranda-Sánchez et al., 2015), analizamos la diversidad α y β de las comunidades de la familia *Rhizobiaceae* que habitan suelos, rizoplano y nódulos de un sitio conservado de Selva Baja Caducifolia en el estado de Morelos y dos sitios agrícolas cercanos. Se utilizó una aproximación metagenómica linaje- y gen-dirigida, basada en la secuenciación de amplicones *recA* clonados. Además aislamos rizobios de nódulos y rizosfera de dos especies del género *Acacia* (huizaches) y dos variedades cultivadas de frijol como hospederos. Nuestra estima de la diversidad estuvo basada en 413 secuencias *recA* obtenidas de librerías de amplicones a partir de DNA metagenómico de suelo, 248 secuencias de nódulo y 298 del rizoplano.

Se logró un buen esfuerzo de muestreo de las comunidades, y este se reflejó en la similitud del número de OTU's predichos por el estimador no paramétrico Chao1 (31-34) y los observados mediante curvas de rarefacción (26-28). Se observó una distribución de cola larga tipo "biosfera rara" de las especies de rizobios en los tres hábitats muestreados. Análisis de componentes principales de variables categóricas demostraron que el hospedero ejerce una selección una fuerte de los rizobios con los que se asocia y dicha selección es más fuerte que la ejercida por el uso de los suelos (conservado vs agrícolas). Sólo una fracción pequeña y específica de la comunidad total de rizobios se asocia con las leguminosas hospederas y esta es planta-específica (*Phaseolus* y *Acacia*).

Se detectaron genotipos especialistas y generalistas en las poblaciones de nódulos de las dos especies dominantes: *Rhizobium etli* y *Rhizobium sp. 1*. Se encontró a *R.*

etli como especie dominante y generalista del ecosistema. Esta especie se recuperó preferencialmente de especies de *Acacia*. Por otro lado, un miembro raro de la comunidad de rizobios del suelo, una especie nueva del género *Rhizobium* (*Rhizobium* sp.1), fue el linaje más prevalente en los nódulos de frijol. La mayoría de sus genotipos son especialistas. Una filogenia del gen *nodC* reveló que la simbiovariedad mimosae es la más abundante en la población de *R. etli*. El gen *nodC* se detectó en el 20% (n=40) de los aislados de *R. etli* del rizoplano.

Identificamos 25 linajes de la familia *Rhizobiaceae*. El inventario de especies de esta familia es el más grande reportado para una sola región hasta ahora. Demostramos el fuerte efecto de filtrado que ejerce la leguminosa hospedera sobre la comunidad de rizobios que habita el suelo y la presencia de genotipos especialistas y generalistas en los principales linajes simbióticos.

Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports

Decision Letter (EMI-2015-1200)**From:** rwhitaker@life.illinois.edu**To:** vinuesa@ccg.unam.mx**CC:** paul@sfam.org.uk**Subject:** Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports - Decision on Manuscript ID EMI-2015-1200**Body:** 17-Sep-2015

Dear Dr. Vinuesa:

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "Diversity patterns of Rhizobiaceae communities inhabiting soils, root-surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes" has been accepted for publication pending a few changes to address remaining concerns of Reviewer 2. Please address these concerns with minor revisions as you move forward.

From this point on, please direct all enquiries related to the production of your paper to the Production Editor:

Production Editor
Environmental Microbiology/Environmental Microbiology Reports
SPi Building, Pascor Drive
Sto. Niño, Parañaque City 1700
Manila, Philippines

Tel +63 2 855 8790
Fax +63 2 325 0768
Email: jrapay@wiley.com

If your manuscript has colour displays, in order to complete the acceptance process, it is necessary for you to provide Wiley immediately with a completed Colour Work Agreement form, which can be downloaded from: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

Please post the completed and signed form to:

Customer Services (OPI)
John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre
New Era Estate
Oldlands Way
Bognor Regis
West Sussex
PO22 9NQ

Diversity patterns of *Rhizobiaceae* communities inhabiting soils, root-surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes

Fabiola Miranda-Sánchez, Javier Rivera and Pablo Vinuesa*

Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.

*Corresponding author. Mailing Address: Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Av. Universidad 1001, Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Mor., México.

Phone/Fax: +52 777 3175867;

E-mail address: vinuesa@ccg.unam.mx (Pablo Vinuesa).

Running title: Community ecology of *Rhizobiaceae*

Keywords: *Rhizobium*, community ecology, ecological specialization, *recA*, *nodC*, *Acacia*, *Phaseolus*, gene-targeted metagenomics, rare biosphere, partner choice.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/1462-2920.13061

1

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Summary

Current knowledge about rhizobial diversity patterns in non-nodule habitats is scarce, limiting our understanding of host effects on their community structure. Here we investigate this topic using a combination of cultivation-dependent and independent approaches to analyze alpha and beta diversity patterns of *Rhizobiaceae* communities from a conserved seasonally-dry tropical forest site in central Mexico and two nearby agricultural fields. Lineage-specific *recA* amplicon libraries were generated from soil DNA and their sequences compared with those from root-surface and nodule isolates recovered in trapping experiments performed with two native and dominant *Acacia* species and two *Phaseolus vulgaris* cultivars. Rarefaction analyses revealed that *Rhizobiaceae* diversity in soils is larger than on root surfaces, and smallest in nodules. A "rare biosphere"-like distribution of species was found in the three habitats. Multivariate statistical analyses demonstrated that the plant genus exerted a stronger influence than the land-usage regime on the diversity of rhizobia associated with hosts. *Rhizobium etli* was the dominant *Rhizobiaceae* found in the soil libraries. It dominated nodulation of *Acacia* spp. and predominately harbored symbiovar mimosae-like *nodC* genes. A novel *Rhizobium* lineage (Rsp1) dominated common bean nodulation. Specialist and generalist genotypes for host nodulation were detected in both species.

Introduction

Symbiotic N₂-fixing root-nodule bacteria comprise a polyphyletic assemblage of α - and β -Proteobacteria collectively known as rhizobia. They are mostly free-living heterotrophs that facultatively establish symbiotic associations with compatible legume hosts (Masson-Boivin *et al.*, 2009; VanInsberghe *et al.*, 2015).

Rhizobia are found in many soil types across the globe, forming part of the microbiomes of diverse plant organs and tissues, including those of non-legumes (Tan *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012; Mora *et al.*, 2014). However, current rhizobial diversity estimates are mostly based on analyses of legume root-nodule isolates. Few studies have explored their diversity in legume rhizospheres (Segovia *et al.*, 1991; Sachs *et al.*, 2009) or directly in soils, using cultivation dependent (Louvrier *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1996) or independent (Zézé *et al.*, 2001; Sarita *et al.*, 2005) approaches. They suggest that rhizobial diversity in non-nodule environments is notably higher than that found within them, as nodules are frequently occupied by a limited number of dominant epidemic clones of a few species (Silva *et al.*, 1999; McInnes *et al.*, 2004; Vinuesa *et al.*, 2005a). Thus, a major knowledge gap currently exists in rhizobial ecology and systematics: virtually nothing is known about the richness, structure and functional aspects of the numerically dominant and genetically most diverse component of rhizobial communities, namely, rhizobia living outside legume nodules. This fact strongly limits our capacity to understand and evaluate key aspects of rhizobial ecology such as competitiveness for nodule occupancy and host effects on rhizobial community diversity.

Here we address these shortcomings by comparing alpha and beta diversity patterns of sympatric *Rhizobiaceae* communities living in soils, root surfaces and nodules of a seasonally-dry tropical forest (SDTF) in the Sierra de Huautla Biosphere Reserve (SHBR, Central Mexico), using cultivation dependent and independent approaches. SDTFs are mega diverse and highly endangered ecosystems, with woody floras dominated by deciduous *Leguminosae* and *Bignoniaceae* that generally form a closed canopy, thorny and succulent species being common, with a sparse ground flora, poor in grass species, which occurs in frost-free regions with a period of at least 5-6 months with < 100 mm of precipitation (Pennington *et al.*, 2009; Linares-

Palomino *et al.*, 2011). The SDTFs in the SHBR are dominated by a high diversity of legume trees and shrubs of the subfamily *Mimosoideae*, like *Acacia* spp., *Lysiloma* spp., and *Mimosa* spp., to mention a few, but all three legume subfamilies (Bruneau *et al.*, 2013) are well represented (Dorado *et al.*, 2005). The SHBR protects the largest remnant of this ecosystem in the state of Morelos (Dorado *et al.*, 2005), which actually comprises a mosaic of primary and secondary forest patches surrounded by agricultural land and small villages that subsist from low-input farming (Martínez-Garza *et al.*, 2011). We sampled soils at a conserved primary forest site and two nearby low-input agricultural plots.

In this study we propose to answer the following main questions: i) what is the magnitude of alpha diversity of the *Rhizobiaceae* family in soils of a well preserved tropical forest rich in diverse legume species? ii) How does it compare with that of nearby agricultural soils? iii) How strong is host selection in structuring rhizobial diversity on legume root surfaces and in nodules?

To answer the first two questions we developed *recA* primers targeting *Rhizobiaceae* with high specificity and broad group coverage, and sequenced amplicons generated from community DNA extracted from soil samples collected at the sites mentioned above. To answer the third one, these data were compared with *recA* sequences generated from isolates obtained from two dominant native *Acacia* species and two *Phaseolus vulgaris* (common bean) cultivars used as trap plants. Comparative analysis of α -diversity patterns across the three habitats (soil, root-surface and nodules), four hosts, and three sites, revealed the strong effect that the host genus and host-associated habitats exert on rhizobial species diversity, including the selection of specific *recA* haplotypes within species. The results are discussed in light of legume-rhizobium mutualism theory and recent findings in microbial community ecology and plant-root microbiome assembly.

Results

Isolation of root nodule and root-surface rhizobia from bean and Acacia plants inoculated with soils from the SHBR

A collection of 564 rhizobial root-surface and root nodule isolates indigenous to soils from the Sierra de Huautla Biosphere Reserve (SHBR) was generated by trapping

experiments with two abundant native *Acacia* species (*A. cochliacantha* and *A. farnesiana*), and two common bean cultivars (Negro Xamapa and Rojo colorado), as detailed in Materials and Methods. The location of the sampling sites and the physico-chemical characteristics of the soils are presented in Supplementary Material (section 1, Fig. S1 and Table S1). A validation experiment of the trapping approach was performed, as detailed in section 2 of Supplementary Material (see also Fig S2; Table S2), which confirmed that it was an efficient means to recover rhizobial diversity without strong bias, as compared to sampling nodules directly from field-grown plants. Statistical analysis (multi-way Chi-square tests) of the diversity of root-surface rhizobia isolated from *Acacia* and bean plants, as conditioned by isolation medium, revealed that the isolation frequency was medium-dependent only for *R. etli* (Ret) and *R. hainanense* complex (Rha_c) from *Acacia* spp. hosts (p-value= 6.3218×10^{-6}). MM-Lac favoured the isolation of Rha_c and PYna120 that of Ret. Those biases were not observed with the two *P. vulgaris* cultivars (Section 4 of Supplementary Material and Fig. S3). Table S3 shows the numbers of strains analyzed in this study, sorted by host, habitat and site.

Unearthing α - and β -diversity patterns of soil rhizobial communities from SDTFs through the analysis of Rhizobiaceae-specific recA clone libraries

We developed a lineage- and gene-targeted metagenomic approach to study the diversity of *Rhizobiaceae* communities in SDTF soils at the species level of taxonomic resolution, based on the *recA* gene, as documented in Materials and Methods and sections 5 and 6 of the Supplementary Material. To assess the reproducibility of the approach, we generated high quality *Rhizobiaceae*-specific clone libraries (see Materials and Methods and Table S3) from three biological replicates of the consA soil, summing 202 sequences (consA_1=66, consA_2=66 and consA_3=70). An unweighted UNIFRAC (uwUNIFRAC) analysis of the replicate libraries grouped them together in relation to the sequences from the two agricultural soils [agrA (n=93) and agrB (n=118)]. Two of the replicates (consA_1 and consA_2) showed no significant uwUNIFRAC difference (Fig. 1AI).

Two additional clone libraries were generated (see Materials and Methods) from the agrA and agrB soil samples. Table S3 lists the number of sequences in each library. Rarefaction curves were computed using an OTU cut-off value of 94% similarity and

average linkage clustering to evaluate the sampling effort of communities (Fig. 1). This cut-off was found to be the best species proxy for this marker and target group, as detailed in Material and Methods. The rarefaction curves of pooled sequences (library + isolates; Table S3) by habitats (Fig. 1A) and sampling sites (Fig. 1B) had not reached their asymptotes, but were levelling off, suggesting that a good sampling depth was achieved. The bulk-soil community (clone-library) was more diverse than the root-surface and nodule communities (Fig. 1A). The observed numbers of OTUs from the root-surface and nodules (based on isolates) were very close to those predicted by the Chao1 estimator (Figures 1A and 1B), indicating that a good species-level sampling was achieved for these habitats. For the soil clone-library, the estimated number of OTUs was ~1.7x larger than that observed (Fig. 1A). This is largely due to the long-tail distribution of low-abundance OTUs revealed by the rank-abundance graphs shown in Fig. 2B and Fig. S6.

Analyses of beta diversity based on weighted (w)UNIFRAC revealed that the communities from the nodule and root-surface habitats are more closely related to each other than to the bulk-soil community, suggesting the existence of host selection effects on the diversity present in the bulk soil (Fig. 1AII).

The pooled sequences from the three sites (consA, agrA and agrB; Table S3) had a similar richness, with an expected (Chao-1) number of OTUs equal to 31, 34 and 31, respectively (Fig. 1B). Again, these figures are very close to the number of observed OTUs (Fig. 1B), revealing a good sampling depth. However, wUNIFRAC analysis showed that the communities from agricultural soils were more similar to each other than to the community from the conserved forest site (Fig. 1BIII).

Phylogenetic classification of recA sequences identifies 25 species-like rhizobial lineages

A maximum likelihood phylogeny (Fig. 2A) was inferred (see Materials and Methods) from the complete set of 977 sequences generated in this study (clone libraries + isolates) plus 46 reference sequences retrieved from GenBank (Table S4), to determine their taxonomic affiliations at the species level. The sequences sorted into 25 conservatively-defined lineages that are largely consistent with named rhizobial species, as defined in the legend of Fig. 2. For the sake of clarity, clades grouping sequences from a named lineage were collapsed. Nineteen of them correspond to

the genus *Rhizobium* and five to the genus *Sinorhizobium* (*Ensifer*). An overview of lineage distribution by sampling site, habitat, and host legume is provided in Table S5. A “rare biosphere”-like distribution of *Rhizobiaceae* lineage abundances was found also among root-surface and nodule isolates (Fig. S6).

The collection was dominated by sequences from the *R. etli* (Ret, n=261), *Rhizobium* sp1 (Rsp1, n=112), *R. mesosinicum* like (Rms_l, n=93) and *Agrobacterium tumefaciens* complex (Atu_c, n=80) clades, representing > 50% of the dataset (Fig. 2B). These lineages have a non-random distribution in the three habitats sampled (library, nodule and root-surface), as shown in the rank-abundance curves presented in Fig. S6. Ret was recovered from the three habitats. Rsp1 most likely represents a novel species closely related to *R. leucaenae* (Ribeiro *et al.*, 2012), which was mainly recovered from bean nodules (Fig. 2A). Sequences affiliated to the “*R. mesosinicum* like” clade were only found in the soil clone library. Only one sequence did not clearly cluster with any reference genus. Its closest blastn hits corresponded to *Mesorhizobium* sequences with 90% of similarity (E-value 7e-135, best hit JN991159). This lineage was therefore labelled as NL (novel lineage). Some clades presented a “fuzzy” taxonomic affiliation (Table S5), and were treated as taxonomic complexes, as defined in the legend to Fig. 2. The *recA* sequences of four *Rhizobium* and one *Sinorhizobium* clades were not closely related (92%-94% identity) to any sequences of these genera available in GenBank, and probably represent novel species.

Principal component analysis reveals that the distribution of Rhizobiaceae lineages in STDFs is mainly determined by habitat and host genus

Principal component analysis of the full dataset revealed that the distribution of lineages is mainly determined by habitats (i.e. bulk-soil, root surface or nodule), as these variables comprise the first and second components, explaining 42% of the variance of the lineage abundances (Figs. 3A and 3B). Lineages clustered in three groups, according to the habitat they were recovered from (Fig. 3A and Fig. S7). Eleven out of the 25 species-like lineages detected were associated with the soil, 8 with the root-surface, and 6 with nodules (Fig. 3A and Fig. S7A-C). The third and fourth components were related to the land use (conserved and agricultural soils, Fig. S8) and explained 27% of the variance in lineage abundance. Taken together, these

results indicate that the host plants exert a stronger impact on the *Rhizobiaceae* lineage abundances than the land use, as suggested also by the beta diversity analyses presented in Figs. 1A and 1B.

The lineages associated with the root-surfaces and nodules of hosts from the same genus partly overlap, indicating that host effects on the selection of rhizobial lineages within genera are less pronounced than across genera, as shown in Fig. 3D. The effects are marked across the genera (*Acacia* vs. *Phaseolus*) and habitats (root-surface vs. nodule), resulting in clear-cut clusters, as shown in Figs. 3C-D and Figs. S7D-F.

Acacia and bean plants are preferentially nodulated by Ret and Rsp1, respectively

The total number of nodule isolates per host, habitat and site are presented in Table S5. They sorted into 15 clades on the ML phylogeny (Fig. 2). The isolation frequency of rhizobial lineages from nodules, conditioned by site and host legume, is shown in Fig. 4A. The numerically dominant symbiotic lineages were Ret (n=261) and Rsp1 (n=112). Mosaic plot analyses (multi-way Chi-squared independence tests) revealed highly significant associations of these lineages with soils (Fig. 4B) and hosts (Fig. 4C). The magnitude of the Pearson residuals indicate that the host plant is a stronger factor than land-usage (soil type) in determining the abundances of these dominant rhizobial species in nodules. A graphical model, summarising the diversity patterns described up to this point, is presented in Fig. S9.

Identification of specialist and generalist Ret and Rsp1 genotypes for nodule occupancy

We analyzed the genetic diversity of the dominant symbiotic species recovered from *Acacia* and *Phaseolus* hosts (Ret and Rsp1, respectively) to reveal possible host-driven partner choice effects at the intra-specific (strain) level. The data presented in Table 1 show a strong and consistent pattern: the numerically dominant species in the nodules of each host had a strongly reduced nucleotide diversity per site (π , 15 to 20-fold) compared to its diversity in the bulk soil and to that of the less dominant species in nodules (~2-fold). A similar trend was also found among Ret root-surface isolates recovered from *Acacia* spp. (Table 1).

We investigated if the observed host-selection of rhizobia was exerted on particular *recA* haplotypes (defined in Table S6). The numbers of *recA* alleles detected among Ret and Rsp1 isolates are listed in Table 1. Tables S7 and Table S8 list the most abundant symbiotic haplotypes for Ret and Rsp1, respectively, and their partitioning among the different habitats and hosts, along with their associated Paired Difference Indexes (PDI) of ecological specialization (Poisot *et al.*, 2012). For both species a clear host-dependent frequency increase of specific haplotypes is observed when compared to their abundance in the soil library. The ecological specialization of Ret haplotypes (Table S7) for specific hosts ranges from generalists ($PDI_{HAP} = 0$) with no host preference (e.g. Hap_6) to specialists ($PDI_{HAP} = 1$, like Hap_16). Rsp1 presented three main symbiotic haplotypes (Table S8), two of them with high specialization for bean nodulation ($PDI_{HAP} \geq 0.85$) and one moderate generalist ($PDI_{HAP} = 0.428$).

Table S9 shows the host and lineage PDI values for all species recovered from nodules, which confirms that both host genera can be nodulated by many lineages (*Acacia*=12; *Phaseolus*=11) of different genera but do so with marked preferences ($PDI > 0.9$). Intermediate levels of host specialization ($PDI > 0.74$, Table S10) were observed regarding rhizobial rhizosphere colonization. A broad range of specialization levels for host nodulation was observed for the different rhizobial species. *R. etli* was confirmed to be a generalist ($PDI_L=0.348$), while the Rsp1 lineage was much more specialized ($PDI_L=0.824$) (Table S9).

Strong phylogenetic clustering of Ret haplotypes by sampling site and nodC allele type

Phylogenetic analysis of the Ret *recA* sequences revealed a strong phylogenetic clustering of haplotypes (n=81) by sampling site (see pies on the branches of the population tree depicted in Fig. 5). Two major clades were resolved (Fig. 5). Clade A grouped alleles recovered almost exclusively from the two agricultural sites. Haplotypes 16 and 79 were the only symbiotic ones from this clade, and were recovered exclusively from bean nodules ($PDI=1$; Table S7). Clade B contains alleles recovered from both agricultural sites and nearly all sequences from the consA site. Most of the latter cluster in a well defined clade (arrow on Fig. 5) that has very few sequences from the agrA and agrB sites. The dominant sequence (Hap_13) in this

clade was recovered mainly from the clone library. Haplotypes exclusively recovered from *Acacia* species or from both host genera are grouped in clade B. Dominant sequences in the clone libraries were not dominant in the nodules, but most of the dominant haplotypes in nodules were also recovered from root-surfaces and in the clone library (Fig. 5). There was no apparent phylogenetic clustering of symbiotic haplotypes regarding host specialization within cluster B (Fig. 5; Table S7). However, the partitioning of *recA* haplotypes into the major clades A and B reflects the clustering of *nodC* sequences from selected isolates (Fig. 5, Fig. S11 and Table S11). Clustering of symbiotic Rsp1 haplotypes (n=16) by site was less evident, as the three dominant ones were recovered from the three sites (Fig. S10). Their relative abundance is directly proportional to their PDI_{HAP} values (0,428-0,872) (Table S8, Fig. S10).

Discussion

This is the first study that makes a comparative analysis of alpha and beta diversity patterns of rhizobial communities inhabiting the bulk-soil, root-surfaces and legume nodules using a combination of cultivation dependent and independent approaches. Rhizobia were isolated to identify possible associations between chromosomal lineages, symbiotic *nodC* sequence phylogroups and host preference. This would have not been possible by analyzing soil amplicons alone.

Rhizobial diversity associated with SDTFs legumes has only been superficially explored in Mexico, reporting the existence of 5 species, including 2 new ones (Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002; Toledo *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Lloret *et al.*, 2007), and the symbiovar mimosae of *R. etli* (Wang *et al.*, 1999). However, due to the mega-diversity of the plant communities, and particularly of legumes found in SDTFs (Pennington *et al.*, 2009; Linares-Palomino *et al.*, 2011), it is reasonable to postulate that a large diversity of rhizobial species inhabit this ecosystem. We used a lineage and gene-targeted metagenomic approach based on Sanger sequencing of cloned *recA* amplicons to study the diversity of *Rhizobiaceae* in the bulk soil of the three sites, as members of this family, particularly *Rhizobium* species, were the dominant ones recovered from the nodules and root-surfaces of the trap plants used. This marker had been previously shown to convey a strong phylogenetic signal, yielding gene trees that are largely consistent with species trees inferred from

multilocus data of diverse rhizobial groups (Vinuesa *et al.*, 2005b; Vinuesa *et al.*, 2008; Vinuesa, 2010). Phylogenetic analysis of the combined sequence set generated in this study (clone library + isolates = 977) identified 17 *Rhizobiaceae* species-like lineages (Fig. 2) in our sample, defined in a highly conservative manner. To our knowledge, this is the largest inventory of *Rhizobiaceae* species reported to date for a single region, including 5 likely new species and all the previously reported ones from the SHBR, with the exception of *R. huautlense*, which is known to be associated with wetlands (Wang *et al.*, 1998; Vinuesa *et al.*, 2005b).

We computed an OTU cut-off value of 94% identity that allowed clustering of sequences into OTUs that essentially recovered the composition of phylogenetic species clades. Although the correlation was not perfect, a problem well known from 16S rRNA gene surveys of microbial diversity (Koeppel and Wu; Schmidt *et al.*, 2015), this tight species proxy allowed us to perform analyses of α - and β -diversity patterns of the target communities at the species level of taxonomic resolution. In addition, the lineage-targeted approach allowed a good taxonomic sampling of the *Rhizobiaceae* community despite sequencing only a few hundred clones. This is consistent with results from other microbial groups and genes (Contreras-Moreira *et al.*, 2009; Sachman-Ruíz *et al.*, 2011). The fact that the observed (range=26-28 OTUs) and expected (Chao1 estimator range: 31-34 OTUs) richness of the three sites sampled were similar (Fig. 1B) strongly supports the statement (Bent and Forney, 2008). However, they differed in composition: the two agricultural sites displayed lower phylogenetic beta diversity and a higher similarity to each other than to the conserved site. Consistent with our data, several studies targeting the 16S rRNA gene with universal primers have revealed that croplands close to patches of tropical forest have a richness similar to that of the forest soils (Jesus *et al.*, 2009; Montecchia *et al.*, 2015), sharing a large common microbiome and showing differences in the abundances of a few lineages.

Rarefaction curves and α -diversity indices (Fig. 1) clearly showed that the richness of *Rhizobiaceae* communities in the bulk soils is higher than that of the isolates recovered from the root-surfaces (~1.7x) and nodules (~3x) of both legume genera analyzed (Fig. 1). This is consistent with previous reports on higher richness of the rhizobial communities associated with rhizospheres than with nodules in *Lotus corniculatus* from New Zealand (Sullivan *et al.*, 1996) and diverse wild-growing *Lotus*

species from the Northern California coast (Sachs *et al.*, 2009). Previous estimates of the proportion of symbiotic to non-symbiotic isolates of *R. leguminosarum* bv. phaseoli from bean rhizospheres was ~2.5% (Segovia *et al.*, 1991). In our work, this ratio for Ret root-surface isolates was ~8x larger (20%; 8/40 positive for *nodC* PCR amplification), showing the same tendency as the previous report. The difference may be due to the larger number of sequences analyzed sequences in our work and a more confident classification of the isolates. However, the proportion of non-symbiotic rhizobia may be much larger in the bulk soil, particularly in areas where potential host legumes are scarce (Sullivan *et al.*, 1996; VanInsberghe *et al.*, 2015).

A rank-abundance analysis of the pooled sequence sets revealed a long-tail distribution of OTUs (Fig. 2) resembling that of the “rare biosphere” found in 16S rRNA gene-based community analyses of diverse habitats (Sogin *et al.*, 2006; Elshahed *et al.*, 2008; Lynch and Neufeld, 2015). Such a distribution may in part reflect sequencing artifacts and PCR biases (Kunin *et al.*, 2010). We applied recommended protocols to minimize PCR drift (Polz and Cavanaugh, 1998) and heteroduplex formation (Acinas *et al.*, 2005), coupled with strict filtering of low quality and potential chimeric or otherwise suspicious sequences (see Material and Methods and section 6 of Supplementary Material) to generate a high quality dataset (Schloss, 2010). Clustering of the dataset at 94% similarity makes it impossible that the rare rhizobial OTUs detected herein represent spurious artifacts that inflate diversity estimates (Huse *et al.*, 2010; Kunin *et al.*, 2010). Rare organisms are known to represent an important amount of ecological potential, particularly in patchy or otherwise heterogeneous and changing environments (Aanderud *et al.*, 2015; Lynch and Neufeld, 2015). This is illustrated in our work by the observation that the dominant species recovered from bean nodules (Rsp1) was a member of the “rare rhizobial biosphere” in the bulk soil, as well as the dominant root-surface lineage *Atu_c* (Fig. S6). The long-tail distribution was also observed among root-surface and nodules isolates (Fig. S6), as previously reported in other systems (McInnes *et al.*, 2004; Sachs *et al.*, 2009).

With the notable exception of *R. etli*, all other lineages strongly associated with a host environment show a significant raise in frequency when compared to their abundance in the bulk soil libraries. Nevertheless, for *R. etli* we could show a strong enrichment of specific haplotypes in the root-surface and nodule habitats. This suggests that

specific host and microbe factors strongly influence the outcome of the interaction and cause the localized proliferation, in space and time, of low-abundance rhizobial species and genotypes. Known rhizobial factors contributing to their dominance in host-associated habitats include numerical dominance in the bulk soil (Thies *et al.*, 1991; Louvrier *et al.*, 1996), high rhizosphere competence (Albareda *et al.*, 2006; Barr *et al.*, 2008; Ramachandran *et al.*, 2011) or better competitiveness for nodule occupancy (Triplett and Sadowsky, 1992). Additionally, host-specific selection (partner choice) of rhizobial genotypes during the early infection process (Simms and Taylor, 2002; Zanetti *et al.*, 2010; Regus *et al.*, 2014), or host sanctions imposed on poor fixers after nodules have developed (Kiers and Denison, 2008; Marco *et al.*, 2009; Sachs *et al.*, 2010; Akcay and Simms, 2011) are known to affect species and strain abundances in host-associated habitats (Thrall *et al.*, 2011). Experimental data are required to unravel the relative contributions of these host and bacterial factors in our system, but the pattern is consistent with the general “multi-step” plant colonization models put forward to explain the gradual differentiation of microbiomes observed in the rhizosphere, rhizoplane and endosphere of diverse plants in regard to the microbial communities present in the surrounding bulk soil (Bulgarelli *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015). In this model, host-specific root exudates fuel the early substrate-driven community shift in the rhizosphere documented for many plant species, with additional host genotype-dependent selection of microbial genotypes that may colonize the root surfaces and internal plant tissues (Peiffer *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015). In legumes, the colonization of nodular tissues and differentiation of bacteroids involves specialized molecular signaling between partners (Madsen *et al.*, 2010; Oldroyd, 2013; Gourion *et al.*, 2015), which adds a further level of fine-grained partner selection in the multi-step model of plant colonization. Here we show that host selection already operates during root-surface colonization by *Rhizobiaceae*, acting both at the species and strain levels. PCAs revealed that both the host genus (*Acacia* and *Phaseolus*) and host environments (root-surface and nodules) have a stronger influence (first and second components, respectively) than the land-usage regime (conserved primary forest vs. low input agricultural sites; third component) in structuring rhizobial communities (Fig. 3). However, this may only hold true for very similar soil types, such as those studied herein (Table S1).

Although *R. etli* is largely regarded as the main bean symbiont in America (Segovia *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2004), in this work it was found to be the dominant species in both *Acacia* hosts, but not in bean nodules. This apparent contradiction may be explained by the fact that recent taxonomic work has revealed that most American strains previously classified as *R. etli*, actually correspond to *R. phaseoli* (López-Guerrero *et al.*, 2012). The ML phylogeny (Fig. 2A) clearly separates both species in distinct clades, and therefore we are confident that our classification of *R. etli* strains is correct, representing the largest *bona fide* population of this species, studied to date. Despite the numeric dominance of *R. etli* in the bulk soil of the conserved and agricultural sites, common beans were found to be preferentially nodulated by the novel Rsp1 lineage, a close relative of *R. leucaenae* (Ribeiro *et al.*, 2012).

A final aspect revealed by our work is that specialist and generalist genotypes for nodulation co-exist within rhizobial species. We found a strong genetic structure of the *R. etli* population, which comprised two major clades that correlated with specialist ($PDI_{HAP}=1$) and generalist ($PDI_{HAP}<0.45$) haplotypes for bean nodulation (Fig. 5, Table S7). This structure may be functionally correlated with the dominance of sv. mimosae-type *nodC* alleles in the latter and sv. phaseoli in the former (Fig 5, Fig S11). *R. etli* sv. mimosae is known to have a broader host-range than sv. phaseoli (Wang *et al.*, 1999; Rogel *et al.*, 2011; Rogel *et al.*, 2014). Future studies are needed to determine the effects of rhizobial pSym type and chromosomal background on the fitness of both partners (Thrall *et al.*, 2011; Bever *et al.*, 2013) in the symbioses established between selected specialist and generalist genotypes with beans and acacias.

Materials and Methods

Description of the sampling sites within the Sierra de Huautla Biosphere Reserve.

Soil samples were taken in July 2012 from a conserved site (consA) and two traditionally managed, low-input, agricultural plots (agrA and agrB), located within the Sierra de Huautla Biosphere Reserve (SHBR), near the community of El Limon de Cuauichinola, in the Southern border of Morelos State, Mexico (consA 18°3'27.60"N 98°56'3.78"W; agrB 18°31'4.73"N 98°56'59.91"W; agrA 18°31'3.65"N 98°57'2.59"W). The pH of the consA soil was 5.1, agrA 5.65 and 6.15 for agrB. A

map and a detailed description of the study sites are shown in Section 1 of Supplementary Material (Fig. S1 and Table S1).

Trapping of rhizobial strains with Phaseolus vulgaris and mimosoid legumes

Rhizobial strains were isolated from nodules and from the root surfaces of two common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Xamapa [Nxam] and cv. Rojo colorado [Rcol]), as well as from two abundant species of native mimosoid legumes, *Acacia farnesiana* (Afarn) and *A. cochliacantha* (Acoch), used as trap plants. Axenically germinated seedlings were inoculated with 2 g of soil and 2 mL of a suspension of 2 g of soil diluted in 8 mL of nutrient solution (10% w/v N-free Norris solution), as detailed in section 2 of Supplementary Material. Bacterial growth was evident after 3-4 days of incubation at 30°C. Nodule isolates chosen for DNA purification were those able to growth on plates with peptone-yeast agar (PY), PY with nalidixic acid (PYnal20, 20 mg/L) and unable to growth on Luria Bertani (LB) media.

Isolation of rhizobia from the root surfaces of common bean and Acacia plants.

Handling of root systems for the recovery of root-surface rhizobia is detailed in section 3 of Supplementary Material. Briefly, the root-surface washing solution was serially diluted and plated on a glucose-based rhizobium-defined medium (GRDM) (Sachs et al., 2009), minimal medium with lactose (MM-lac) (Segovia et al., 1991), and PY nal20. All media contained cycloheximide (100mg/L) as antifungal agent and were incubated at 30°C. The bacteria recovered on these media will be referred to as “root-surface isolates”. Colonies were selectively isolated by growth rate (3-4 days), morphology (glossy texture) and color (whitish to yellowish). The isolates were selected by their ability to grown on PYnal20 and lack of growth on LB, and confirmed by a PCR-based identification assay described in section 3 of Supplementary Material. Nodule and root-surface isolates were preserved in 25% glycerol-20E media at -80°C.

PCR-amplification of recA and nodC fragments from bacterial isolates.

Genomic DNA from bacterial isolates was purified using a commercial kit (no.12224-250, MO BIO, CA USA). Three primers were used to amplify *recA* fragments. The primer set 41F/640R amplifies a *recA* fragment of α -rhizobia (Vinuesa et al., 2005b;

Vinuesa *et al.*, 2005a). The 64F primer (5'-GACAAAAGCAAGGCRCTBGAA-3') was designed in this study and specifically targets *recA* from *Rhizobiaceae*. The coverage and specificity of the 64F/640R primer pair was evaluated using DNA from 37 *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* reference strains (Fig. S4). Amplification protocols were as previously reported (Vinuesa *et al.*, 2005a), except that for the F64/R640 pair, the annealing temperature was 56 °C. The primers and amplification protocol for a *nodC* fragment was described elsewhere (Sarita *et al.*, 2005), but the reverse primer was modified (5'-CGMGACARCCARTCRCTRRTTG-3') and the annealing temperature was set to 58°C. PCR products were purified using commercial columns (no. K0692, Fermentas, LE, EU).

Construction of recA-amplicon clone libraries from soil metagenomic DNA.

Metagenomic DNA was purified from 1g of soil per site (three replicates of *consA*, and one for *agrA* and *agrB*, from the same soil sample used for trapping experiments), using MOBIO's soil maxi-prep DNA purification kit (no.12988-10 MO BIO, CA, USA). A post purification step was performed to remove PCR inhibitors from DNA preps (no.12877-50, MO BIO, CA, USA). Seven replicate PCRs were run with 30ng/uL of DNA with the *Rhizobiaceae*-specific primers 64F/640R for 25 cycles, pooled (Polz and Cavanaugh, 1998), and subjected to a reconditioning PCR amplification protocol (Acinas *et al.*, 2005) consisting in a second round of 5 cycles with fresh reagents using a 1/10 dilution of the pooled amplicons from the first round. A hot start protocol was used to minimize the generation of unspecific amplicons (Fermentas Maxima hotstart Taq polymerase, no. EP0603, Fermentas, LE, EU). The amplicons were column-purified (no. K0692, Fermentas, LE, EU) and cloned into TOPO pCR4.0 vector (no. K4575-02, Invitrogen, CA, USA) and transformed into *E. coli* DH5 α , following the manufacturer's instructions. Plasmids were purified from white colonies using the standard alkaline-lysis protocol (Sambrook and Russell, 2001).

Sequencing of recA-and nodC amplicons from isolates and soil clone libraries

recA and *nodC* amplicons from isolates were commercially sequenced with the primers used for PCR, while libraries of cloned soil amplicons were sequenced with the M13F primer, using Sanger protocol at MacroGen Inc. (Seoul, Korea). The 5' and 3' sequence ends were trimmed based on phred quality scores using phred (Ewing

and Green, 1998). Non-Rhizobiaceae sequences in *recA* clone-libraries were detected based on BLASTX (Altschul *et al.*, 1997) querying of an in-house database of non-redundant, high-quality reference sequences of the family, and removed from the dataset. The remaining sequences were checked for possible chimeras using Bellerophon (Huber *et al.*, 2004) and Ccode (González *et al.*, 2005) algorithms called from the mothur software version 1.33.1 (Schloss *et al.*, 2009). Multiple sequence alignments were generated with muscle version 3.8.31 (Edgar, 2004) and manually curated. A final curation step was performed by eliminating sequences that produced notoriously long branches in maximum likelihood phylogenies.

Sequence accession numbers

All sequences generated in this study have been deposited in GenBank under the accession numbers KR400013-KR400989 for *recA* and KR558668-KR558676 for *nodC* sequences.

Phylogenetic analysis of rhizobial recA sequences.

recA and *nodC* phylogenies were inferred under the maximum-likelihood (ML) optimality criterion using PHYML3 (Guindon *et al.*, 2010) and the best-fitting GTR+G+I model. Tree searching for the large *recA* dataset was performed under the BEST moves algorithm, using 1000 random seed trees in addition to a BioNJ tree to start 1001 searches, as previously described (Vinuesa *et al.*, 2008; Vinuesa, 2010). The bipartition support was evaluated by the Shimodaria-Hasegawa-like approximate LRT test (Anisimova and Gascuel, 2006). Reference *recA* sequences and their accession numbers are listed in Table S3. A ML population tree (GTR+I+G model) was inferred from the *Rhizobium etli* (Ret) haplotypes as described before. The site, habitat, symbiotic host and *nodC* allele-type categorical variables were mapped on the population tree using iTOL (Letunic and Bork, 2011).

Estimation of α and β diversity parameters of Rhizobiaceae communities and the calculation of a proper clustering cut-off value.

We selected 136 non-redundant *recA* sequences of bona fide isolates from 10 species of *Rhizobium* and *Sinorhizobium*, respectively, recovered from different geographic regions (to maximize the sampling of the species' genetic diversity), to calculate an adequate sequence similarity cut-off for OTU-based estimators of α -

diversity. A K80 distance matrix was calculated for the sequence sets of each species with the ape R package (version 3.1-4) (Paradis *et al.*, 2004; Borcard *et al.*, 2011; R Development Core Team, 2015) using the `dist.dna` function with default settings. We computed the maximum distance values for each species and from these values we took the median as the clustering cut-off (94% similarity) of sequences into OTUs using average linkage (Schmidt *et al.*, 2015). This worked as a tight and conservative proxy for the species level of Rhizobiaceae with the *recA* region used in this study. Rarefaction curves, Chao1, Simpson and Shannon indexes (Bent and Forney, 2008), weighted and unweighted UNIFRAC analyses (Lozupone *et al.*, 2010), were computed with `mothur` (Schloss *et al.*, 2009).

Multivariate analysis of categorical data

Every *recA* sequence generated in this study had associated categorical variables such as taxonomic lineage, habitat, soil and host plant. We performed principal component analyses (PCAs) with R packages to reveal the partitioning of rhizobial lineages across sampling sites, habitats and host plants. Given that PCA is designed for quantitative variables, the categorical variables were transformed into dummy binary variables (Borcard *et al.*, 2011) using the `decostand` function with the chord normalization (option “norm”) implemented in `vegan` (Oksanen *et al.*, 2014). The actual PCA was carried out with the `FactoMineR` package (Husson *et al.*, 2014). A hierarchical cluster analysis was performed after the PCA analysis to delimit the lineage clusters with the `hcpc` function available in `FactoMineR` (Fig S7), using Ward’s algorithm with k-means partitioning.

Mosaic plots of the abundance of symbiotic lineages conditioned on host and soil were generated with the `vcd` package (Meyer *et al.*, 2014). These plots display the results of a Chi-square independence test, graphing the sum of squares of the Pearson residuals and shading each comparison using Friendly’s shading scheme. Barplots were generated with the `ggplot2` package (Wickham, 2009).

Estimation of the intraspecific genetic diversity of R. etli and Rhizobium sp1 based on recA sequences

The number of haplotypes (h) and nucleotide diversity per site (π) was computed with DNASP v5.10 (Librado and Rozas, 2009). The haplotype frequencies were

estimated with Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer, 2011). The Paired Difference Index (PDI) of ecological specialization (Poisot et al., 2012) was computed for the host (PDI_H), rhizobial lineages (PDI_L) and the Ret and Rsp1 symbiotic haplotypes (PDI_{HAP}), using R's bipartite v2.3-2 package (Dorman, 2011). The confidence limits at 95, 99 and 99.9% for the PDI data were computed from 1000 simulated datasets corresponding to all lineages recovered from root-surfaces and nodules, as well as for the Ret and Rsp1 symbiotic haplotypes, using the table row sums as given marginals for the simulation. The simulations were performed with the r2dtable command from R's stats base package, and the confidence limits calculated from the simulated data with the R's t.test command.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Cristina Martínez-Garza (CIByC-UAEM) and Gerardo Pacheco (El Limón de Cuauchichinola) for expert field assistance and for providing *Acacia* seeds. We thank Enrique Zozaya for assistance with the primer design and Susana Brom, Claudia Silva and Michael Dunn for critically reading the manuscript. This work is part of FMS's Ph.D. work in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was supported by a PhD scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) and student travel scholarships from PAEP-UNAM. Financial support obtained from CONACyT-México (grants P1-60071 and 179133 to PV) is gratefully acknowledged.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest.

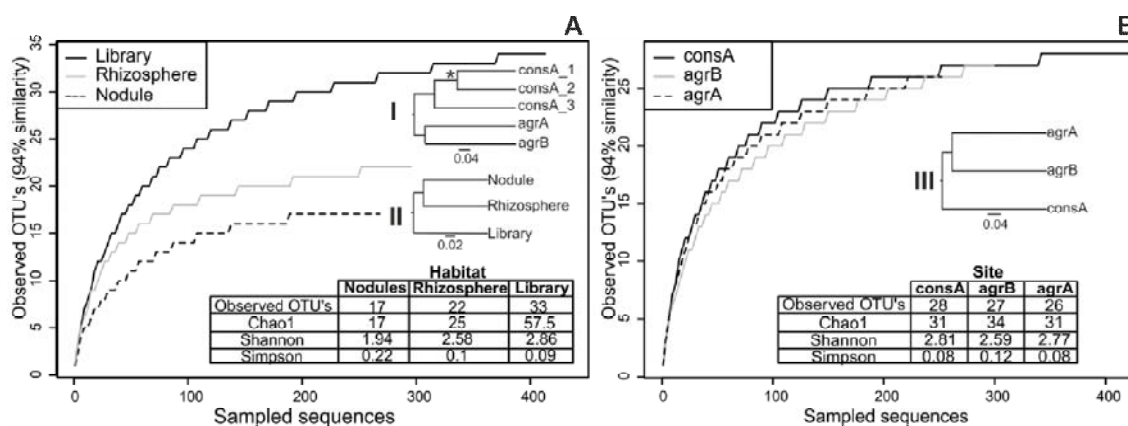


Fig 1. Alpha- and β -diversity patterns of rhizobial communities from SDTFs based on *recA* sequences. Panel A shows rarefaction curves (OTU clustering cut-off value $\geq 94\%$ similarity) for all *recA* sequences generated in this study ($n=977$), originating from the bulk-soil library, root-surface and nodule isolates. Inset I shows the results of uwUNIFRAC UPGMA-clustering of 3 soil clone libraries (biological replicates) from the consA site. Inset II shows the wUNIFRAC clustering of the sequences derived from the three habitats analyzed herein. An asterisc (*) indicates the comparison with non-significant UNIFRAC scores ($p > 0.05$ in 1000 iterations for the test). Panel B shows rarefaction curves at the same cut-off for the pooled sequences (library + isolates) for each sampling site. Inset III shows the wUNIFRAC clustering of the corresponding sequences. The tables present the values of selected alpha diversity indices and the non-parametric Chao-1 richness estimator.

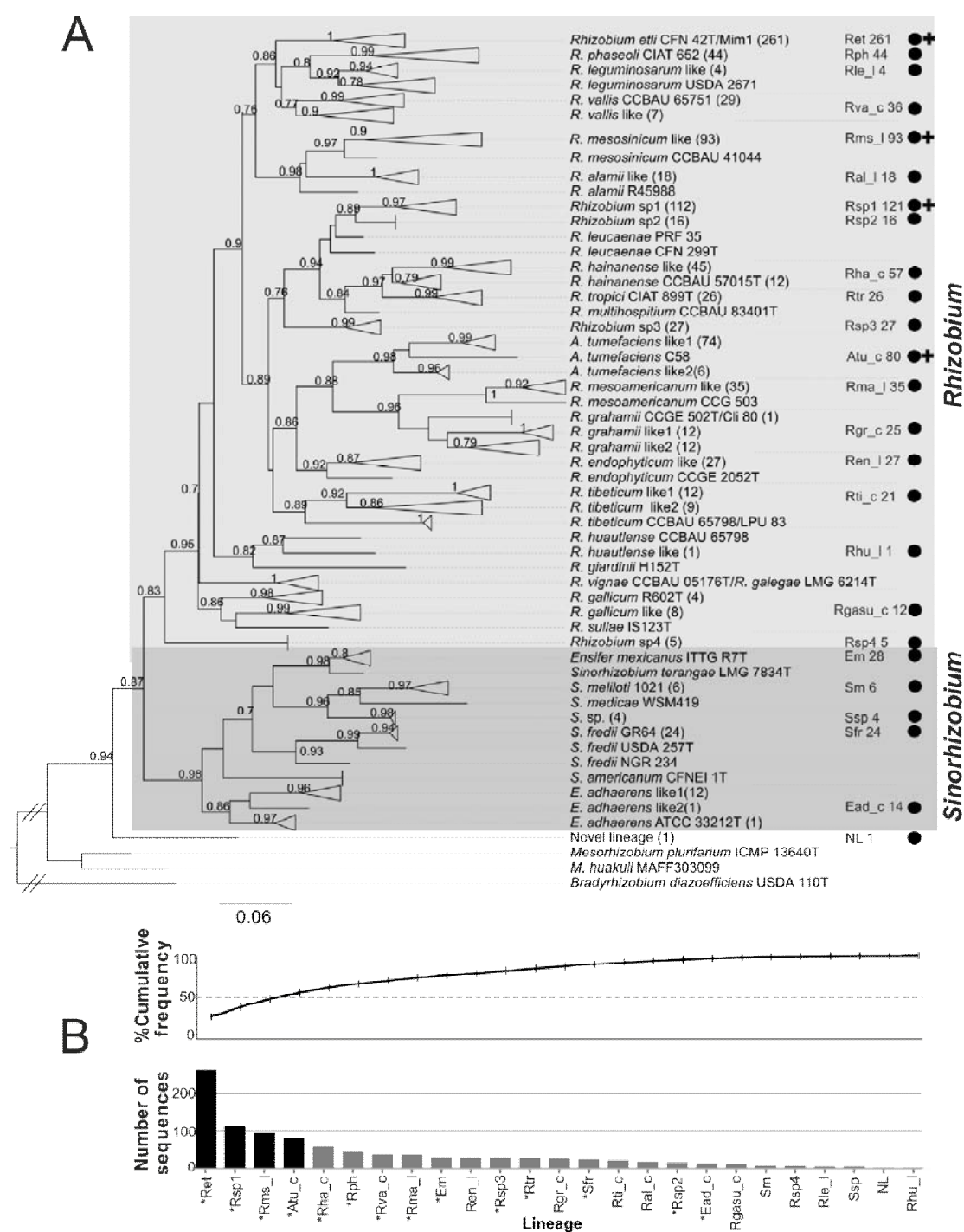


Fig. 2. Phylogenetic analysis and classification of the whole sequence set identifies 25 species-like lineages. Panel A shows a collapsed ML-Phylogeny (GTR+I+G model) of the rhizobial *recA* sequences (385 non-gapped sites) generated in this study ($n=977$, clones + isolates). Support values (SH-like) greater than 0.70 are indicated at the nodes. The collapsed clades are labeled with selected reference strains (see Table S4) when taxonomy and phylogeny agree. Clades labeled as “*taxon_like*” are those with a well supported sister relationship to a clade containing a reference strain, where “*taxon*” corresponds to the name of the bona-fide sister group. However, the former form independent clusters according with the OTU similarity cut-off ($\geq 94\%$) used in α -diversity estimation. Novel lineages are labeled as Rsp and Ssp, with consecutive numbers. The numbers of sequences in each

clade are indicated in parentheses. The right-most column shows a filled circle to highlight the taxonomic affiliation of the sequences generated in this study, along with a short identification key and the number of sequences they contain. The clades labeled as “*taxon_c*” group different taxa that do not correlate well with their phylogenetic placement and are treated herein as taxonomic complexes. They may include more than two lineages labeled as “*taxon_like*”. The four numerically dominant lineages are highlighted with a plus sign (+). B. Rank-abundance of lineages and their cumulative frequency (%). The lineages that contain nodule isolates are indicated with an asterisk (*) on the x-axis labels.

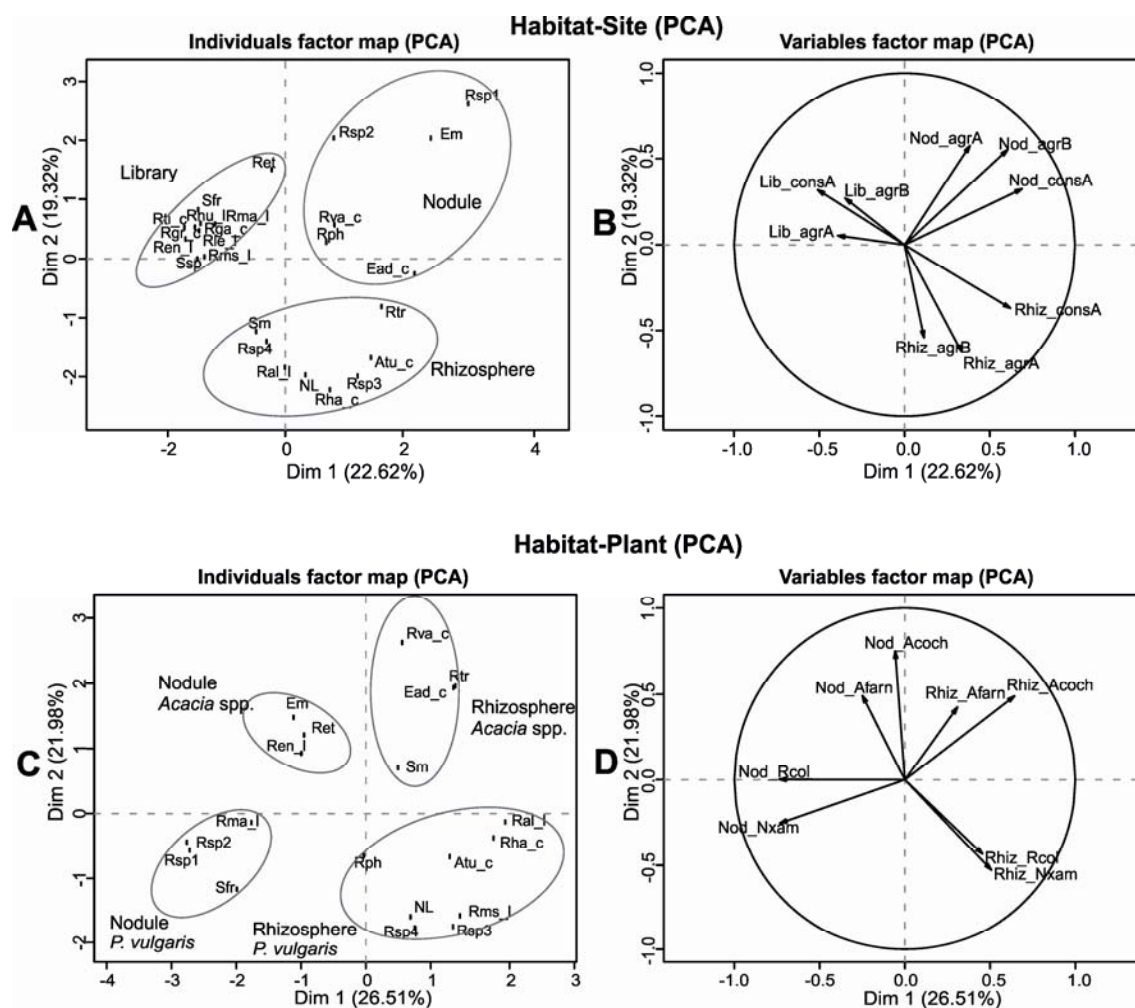


Fig.3. PCA of lineage distribution across habitats, soils and host plants. Principal component analysis of the categorical variables habitat and site (panels A and B) and habitat and legume (panels C and D). The principal components (Dim1 and Dim2) are ordinated in xy-axes. The percentage of contribution to the inertia (variance) of the lineages is shown in parenthesis. The lineages are plotted on panels A and C, the variables on B and D. The lineage labels and variables in panel A are circled by their habitat association (library, root-surface and nodule) according to the results from cluster analyses presented in Fig. S7. In panel C circles denote clusters of OTUs by habitat (nodule and root-surface) and host (*Acacia* spp. and *P. vulgaris*).

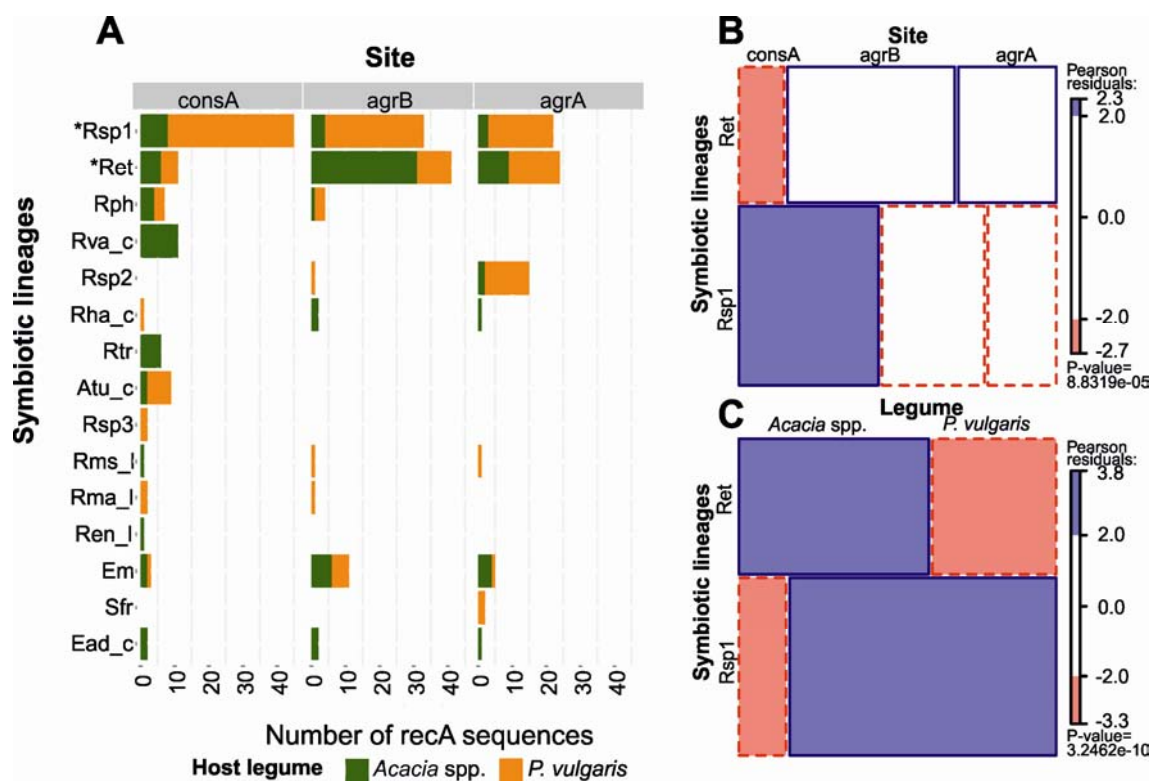


Fig. 4. Statistical analysis of rhizobial diversity recovered from nodules conditional to site and host. Barplot representation of the abundance of symbiotic rhizobial lineages by sites and hosts. The colors indicate the host legume (A). The two predominant symbiotic lineages are marked on the y-axis with an asterisk (*). Mosaic plots of *R. etli* (Ret) and *Rhizobium* sp1 (Rsp1) abundances conditional on site (B) and host legume (C). Mosaics are colored by the level of significance of the Pearson residuals.

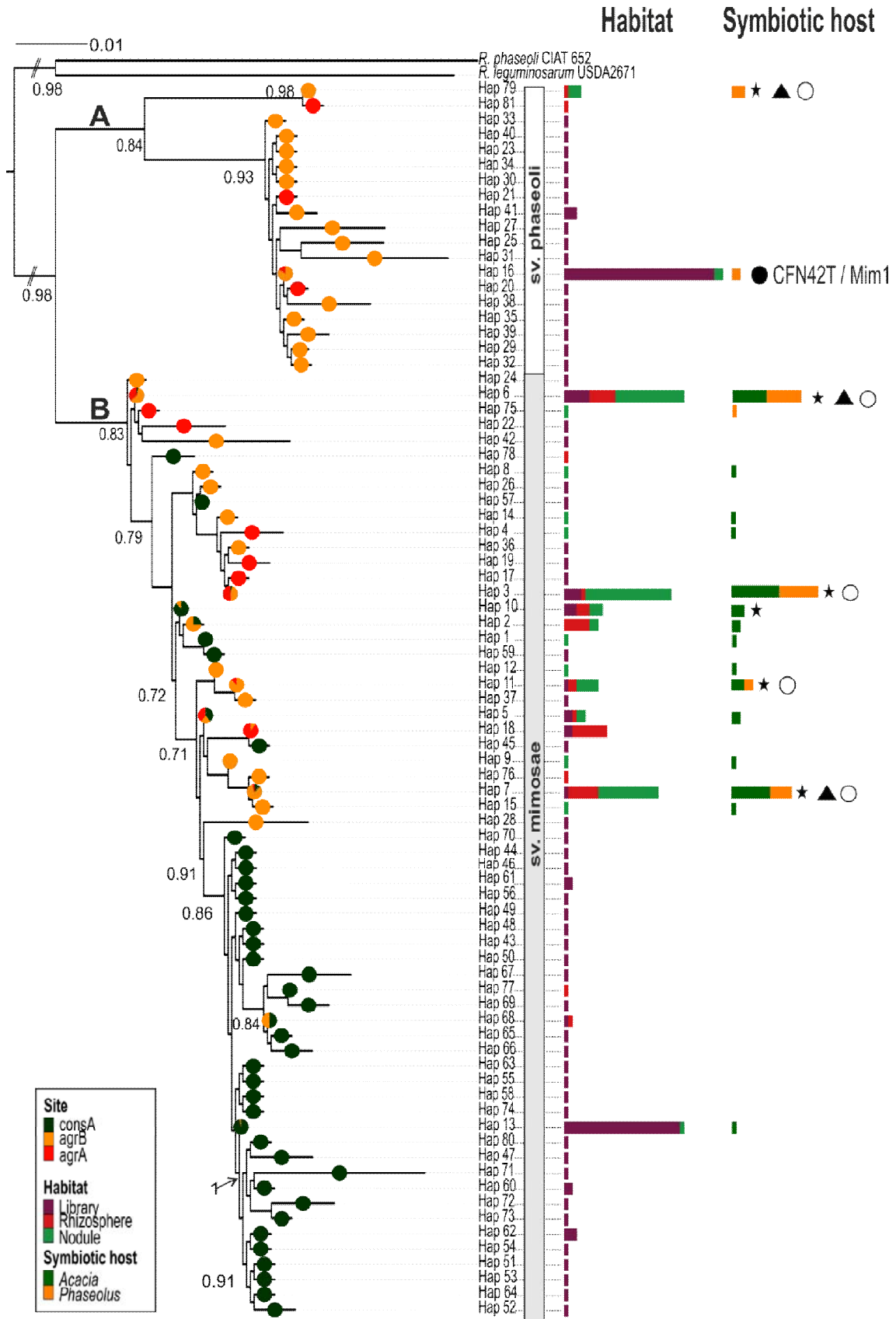


Fig. 5. Population tree of Ret *recA* haplotypes and their frequency by habitat, soil and host. ML population tree (GTR+I+G) of the 81 Ret haplotypes recovered (clone library + isolates). The numbers on selected bipartitions indicate the SH-like support values. The pie-charts on the branches indicate

the relative frequency of the haplotypes by isolation site. The first barplots indicate the frequency of recovery of the haplotypes from the sampled habitats (bulk-soil library, root-surface and nodule). The second barplot column shows the partitioning of nodule isolates by host. The haplotype 16 (Hap_16) corresponds to the same allele as that of the CFN42 and Mim1 reference strains (filled circle). The main haplotypes recovered from nodules are marked with stars. The *R. etli* population is structured in two groups. The gray bars indicate the symbiovar type, inferred from the phylogeny of a *nodC* fragment (see Fig. S10 and Table S9) amplified from representative isolates of the haplotypes marked with an empty circle. A triangle indicates haplotypes yielding *nodC* amplicons from root-surface isolates (Hap_6=2, Hap_7=3, Hap_79=1 out of 40 Ret root-surface isolates).

References

1. Aanderud, Z.T., Jones, S.E., Fierer, N., and Lennon, J.T. (2015) Resuscitation of the rare biosphere contributes to pulses of ecosystem activity. *Front Microbiol* **6**: 24.
2. Acinas, S.G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M.F. (2005) PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8966-8969.
3. Aguilar, O.M., Riva, O., and Peltzer, E. (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13548-13553.
4. Akcay, E., and Simms, E.L. (2011) Negotiation, sanctions, and context dependency in the legume-*Rhizobium* mutualism. *Am Nat* **178**: 1-14.
5. Albareda, M., Dardanelli, M.S., Sousa, C., Megias, M., Temprano, F., and Rodríguez-Navarro, D.N. (2006) Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 67-73.
6. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
7. Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* **55**: 539-552.
8. Barr, M., East, A.K., Leonard, M., Mauchline, T.H., and Poole, P.S. (2008) In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae A34 expressed in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Lett* **282**: 219-227.
9. Bent, S.J., and Forney, L.J. (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2**: 689-695.
10. Bever, J.D., Broadhurst, L.M., and Thrall, P.H. (2013) Microbial phylotype composition and diversity predicts plant productivity and plant-soil feedbacks. *Ecol Lett* **16**: 167-174.
11. Borcard, D., Gillet, F., and Legendre, P. (2011) *Numerical ecology with R*. Springer-Verlag New York.
12. Brown, S.D., Utturkar, S.M., Klingeman, D.M., Johnson, C.M., Martin, S.L., Land, M.L. et al. (2012) Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *J Bacteriol* **194**: 5991-5993.
13. Bruneau, A., Doyle, J.J., Herendeen, P., Hughes, C., Kenicer, G., Lewis, G. et al. (2013) Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217-248.
14. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 807-838.
15. Contreras-Moreira, B., Sachman-Ruiz, B., Figueroa-Palacios, I., and Vinuesa, P. (2009) primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Res* **37**: W95-W100.
16. Dorado, O., Maldonado, B., Arias, D.M., Sorani, V., R., R., Leyva, E., and Valenzuela, D. (2005) Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. In: México D.F.: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, p. 210.
17. Dorman, C.F. (2011) How to be a specialist? Quantifying specialisation in pollination networks. *Network Biology*: 1-20.
18. Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797.
19. Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar, S. et al. (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E911-E920.

20. Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Spain, A.M., Sheik, C., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O. et al. (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5422-5428.
21. Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**: 186-194.
22. Excoffier, L., and Lischer, H.E. (2011) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* **10**: 564-567.
23. González, J.M., Zimmermann, J., and Sáiz-Jiménez, C. (2005) Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. *Bioinformatics* **21**: 333-337.
24. Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., and Stacey, G. (2015) *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* **20**: 186-194.
25. Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**: 307-321.
26. Huber, T., Faulkner, G., and Hugenholz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317-2319.
27. Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., and Sogin, M.L. (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* **12**: 1889-1898.
28. Husson, F., Josse, J., Le, S., and Mazet, J. (2014). FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R. *v1.29*
29. Jesus, E.C., Marsh, T.L., Tiedje, J.M., and Moreira, F.M. (2009) Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME J* **3**: 1004-1011.
30. Ji, K.X., Chi, F., Yang, M.F., Shen, S.H., Jing, Y.X., Dazzo, F.B., and Cheng, H.P. (2010) Movement of rhizobia inside tobacco and lifestyle alternation from endophytes to free-living rhizobia on leaves. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 238-244.
31. Kiers, E.T., and Denison, R.F. (2008) Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annu Rev Ecol Syst* **39**: 215-236.
32. Koepfel, A.F., and Wu, M. (2013) Surprisingly extensive mixed phylogenetic and ecological signals among bacterial Operational Taxonomic Units. *Nucleic Acids Res* **41**: 5175-5188.
33. Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., and Hugenholz, P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* **12**: 118-123.
34. Letunic, I., and Bork, P. (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* **39**: W475-W478.
35. Librado, P., and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
36. Linares-Palomino, R., Oliveira-Fihlo, A.T., and Pennington, R.T. (2011) Neotropical Seasonally Dry Forest: Diversity, Endemism, and Biogeography of Woody Plants. In *Seasonally dry tropical forests : ecology and conservation*. Dirzo, R. (ed). Washington. D.C. : Island Press.
37. López-Guerrero, M.G., Ormeno-Orrillo, E., Velázquez, E., Rogel, M.A., Acosta, J.L., González, V. et al. (2012) *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Syst Appl Microbiol* **35**: 353-358.
38. Louvrier, P., Laguerre, G., and Amarger, N. (1996) Distribution of Symbiotic Genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae Populations Isolated Directly from Soils. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4202-4205.
39. Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., and Knight, R. (2010) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* **5**: 169-172.
40. Lynch, M.D., and Neufeld, J.D. (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol* **13**: 217-229.
41. Lloret, L., Ormeño-Orrillo, E., Rincón, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M.A., and Martínez-Romero, E. (2007) *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* **30**: 280-290.
42. Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S. et al. (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**: 10.
43. Marco, D.E., Carbajal, J.P., Cannas, S., Pérez-Arnedo, R., Hidalgo-Perea, A., Olivares, J. et al. (2009) An experimental and modelling exploration of the host-sanction hypothesis in legume-rhizobia mutualism. *J Theor Biol* **259**: 423-433.
44. Martínez-Garza, C., Osorio-Beristain, M., Valenzuela-Galván, D., and Nicolás-Medina, A. (2011) Intra and inter-annual variation in seed rain in a secondary dry tropical forest excluded from chronic disturbance. *For Ecol Manage* **262**: 2207-2218.
45. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458-466.
46. McInnes, A., Thies, J.E., Abbott, L.K., and Howieson, J.G. (2004) Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities - a review. *Soil Biol Biochem* **36**: 1295-1308.
47. Meyer, D., Zeileis, A., and Hornik, K. (2014). vcd: Visualizing Categorical Data. *v1.3-2*
48. Montecchia, M.S., Tosi, M., Soria, M.A., Vogrig, J.A., Sydorenko, O., and Correa, O.S. (2015) Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of yungas forests to agriculture. *PLoS One* **10**: e0119426.

49. Mora, Y., Díaz, R., Vargas-Lagunas, C., Peralta, H., Guerrero, G., Aguilar, A. et al. (2014) Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5644-5654.
50. Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B. et al. (2014). vegan: Community Ecology. v2.2-0
51. Oldroyd, G.E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252-263.
52. Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290.
53. Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L. et al. (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 6548-6553.
54. Pennington, R.T., Lavin, M., and Oliveira-Fihlo, A.T. (2009) Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annu Rev Ecol Syst* **40**: 437-457.
55. Poisot, T., Canard, E., Mouquet, N., and Hochberg, M.E. (2012) A comparative study of ecological specialization estimators. *Methods Ecol Evol* **3**: 537-544.
56. Polz, M.F., and Cavanaugh, C.M. (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3724-3730.
57. R Development Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. v3.1.3
58. Ramachandran, V.K., East, A.K., Karunakaran, R., Downie, J.A., and Poole, P.S. (2011) Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. *Genome Biol* **12**: R106.
59. Regus, J.U., Gano, K.A., Hollowell, A.C., and Sachs, J.L. (2014) Efficiency of partner choice and sanctions in *Lotus* is not altered by nitrogen fertilization. *Proc Biol Sci* **281**: 20132587.
60. Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez, J. et al. (2012) Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 1179-1184.
61. Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., and Martínez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* **34**: 96-104.
62. Rogel, M.A., Bustos, P., Santamaría, R.I., González, V., Romero, D., Cevallos, M.A. et al. (2014) Genomic basis of symbiovar mimosae in *Rhizobium etli*. *BMC Genomics* **15**: 575.
63. Sachman-Ruiz, B., Contreras-Moreira, B., Zozaya, E., Martínez-Garza, C., and Vinuesa, P. (2011) primers4clades, a web server to design lineage-specific PCR primers for gene-targeted metagenomics In *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. de Bruijn, F.J. (ed): Wiley/Blackwell, pp. 441-452.
64. Sachs, J.L., Kembel, S.W., Lau, A.H., and Simms, E.L. (2009) In situ phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4727-4735.
65. Sachs, J.L., Russell, J.E., Lii, Y.E., Black, K.C., López, G., and Patil, A.S. (2010) Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. *J Evol Biol* **23**: 1919-1927.
66. Sarita, S., Sharma, P.K., Priefer, U.B., and Prell, J. (2005) Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 1-11.
67. Schloss, P.D. (2010) The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol* **6**: e1000844.
68. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537-7541.
69. Schmidt, T.S., Matías Rodrigues, J.F., and von Mering, C. (2015) Limits to robustness and reproducibility in the demarcation of operational taxonomic units. *Environ Microbiol* **17**: 1689-1706.
70. Segovia, L., Young, J.P., and Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 374-377.
71. Segovia, L., Pinero, D., Palacios, R., and Martínez-Romero, E. (1991) Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 426-433.
72. Silva, C., Eguiarte, L.E., and Souza, V. (1999) Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol Ecol* **8**: 277-287.
73. Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Martínez-Romero, E., and Souza, V. (2003) *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Appl Environ Microbiol* **69**: 884-893.
74. Simms, E.L., and Taylor, D.L. (2002) Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integr Comp Biol* **42**: 369-380.
75. Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R. et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12115-12120.
76. Sullivan, J.T., Eardly, B.D., van Berkum, P., and Ronson, C.W. (1996) Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2818-2825.
77. Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Muller, P., Ladha, J.K., and Reinhold-Hurek, B. (2001) Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3655-3664.

78. Thies, J.E., Singleton, P.W., and Bohlool, B.B. (1991) Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Appl Environ Microbiol* **57**: 19-28.
79. Thrall, P.H., Laine, A.L., Broadhurst, L.M., Bagnall, D.J., and Brockwell, J. (2011) Symbiotic effectiveness of rhizobial mutualists varies in interactions with native Australian legume genera. *PLoS One* **6**: e23545.
80. Toledo, I., Lloret, L., and Martínez-Romero, E. (2003) *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst Appl Microbiol* **26**: 54-64.
81. Triplett, E.W., and Sadowsky, M.J. (1992) Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol* **46**: 399-428.
82. VanInsberghe, D., Maas, K.R., Cardenas, E., Strachan, C.R., Hallam, S.J., and Mohn, W.W. (2015) Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *ISME J* **in press**.
83. Vinuesa, P. (2010) Multilocus Sequence Analysis and Bacterial Species Phylogeny Estimation. In *Molecular Phylogeny of Microorganisms*. Oren, A., and Papke, R. (eds). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 41-64.
84. Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., and Martínez-Romero, E. (2005a) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* **34**: 29-54.
85. Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M.J., Izaguirre-Mayoral, M.L., Bedmar, E.J., and Martínez-Romero, E. (2005b) 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**: 702-716.
86. Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S.K., Prasad, B.N., Moe, H. et al. (2008) Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the asiatic continent. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6987-6996.
87. Wang, E.T., Rogel, M.A., García-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M.A., and Martínez-Romero, E. (1999) *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**: 1479-1491.
88. Wang, E.T., Tan, Z.Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B., and Martínez-Romero, E. (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.
89. Wang, E.T., Kan, F.L., Tan, Z.Y., Toledo, I., Chen, W.X., and Martínez-Romero, E. (2003) Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. *Arch Microbiol* **180**: 444-454.
90. Wang, E.T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X.H., Dorado, O., Chen, W.X., and Martínez-Romero, E. (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.
91. Wickham, H. (2009) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. New York: Springer.
92. Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M. (2010) A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* **22**: 4142-4157.
93. Zézé, A., Mutch, L.A., and Young, J.P. (2001) Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ Microbiol* **3**: 363-370.

Supplementary Material

Diversity patterns of *Rhizobiaceae* communities inhabiting soils, root-surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes

Fabiola Miranda-Sánchez, Javier Rivera and Pablo Vinuesa*

Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

Fabiola Miranda-Sánchez: fmiranda@ccg.unam.mx

Javier Rivera: javier@ccg.unam.mx

Pablo Vinuesa*: vinuesa@ccg.unam.mx

***Corresponding author.**

Address: Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Av. Universidad 1001, Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Mor., México. Phone/Fax: +52 777-3175867.
E-mail address: vinuesa@ccg.unam.mx (Pablo Vinuesa).

Index

1. Description and location of the sampling sites.....	65
2. Validation of the trapping approach as an efficient means to recover rhizobial diversity without strong bias.....	67
3. Sample-Treatment for rhizobia isolation from the root surfaces of common bean and Acacia plants	69
4. Analyses of the dependent-culture approach in the isolation of rhizobia from rhizosphere.....	70
5. Selection of the <i>recA</i> gene for rhizobial taxonomic assignments and diversity estimation	71
6. Analysis of the taxonomic specificity and coverage of the <i>recA</i> -64F/ <i>recA</i> -640R primer set targeting the <i>Rhizobiaceae</i>	72
7. Overview of the number of <i>recA</i> sequences per host, habitat and site obtained in this study.....	73
8. Reference <i>recA</i> sequences used for phylogenetic classification of the clone library and isolate sequences generated in this study.....	74
9. Phylogenetic classification of all <i>recA</i> sequences generated in this study.....	74
10. Overview of the <i>recA</i> sequence numbers obtained per lineage for nodule (A) and root-surface isolates (B), and soil library clones (C) obtained in this study.....	77
11. Hierarchical Clustering of Principal Components (HCPC) performed to delimit clusters of lineages by habitats and hosts.....	78
12. Analysis of the 3 rd and 4 th Principal Components of lineage distribution across habitats and site.....	79
13. A graphical model for the diversity of <i>Rhizobiaceae</i> communities in soils, root surfaces and nodules of SDTF soils with different land usage in the SHBR.....	80
14. <i>Rhizobium etli</i> (Ret) and <i>Rhizobium sp</i> (Rsp1) haplotypes recovered in this study.....	81
15. Analysis of ecological specialization for host at species and haplotype levels.....	85
16. Population tree of Rsp1 haplotypes and their frequency of occurrence by site, habitat, and host.....	88
17. <i>Rhizobium etli</i> (Ret) of SDTF exhibits phaseoli and mimosae <i>nodC</i> alleles.....	89
References	90

1. Description and location of the sampling sites

We sampled three sites of seasonally-dry tropical forest (SDTF) within the Sierra de Huautla Biosphere Reserve (SHBR): a conserved primary forest patch and two traditionally managed agricultural plots. The SHBR is located at the Southern border of Morelos State, in Central Mexico (Fig. S1).

The samples were taken in July 2012. Each soil sample was composed of ten sub-samples, randomly taken along 30m-long diagonal transects of each site from ~15cm depth to avoid the top layer of plant litter. Physico-chemical soil parameters are shown in Table S1.

The consA site is located in a patch of primary forest. Site agrA has been moderately fertilized for the last 30 years, while site agrB was recently deforested and had been used for agricultural purposes ~5 years before sampling, without fertilization. Maize has been cultivated on both agricultural sites during 5 years before sampling. The distance between conserved and agricultural sites is ~1.8Km. The agricultural sites are separated by ~200m from each other.

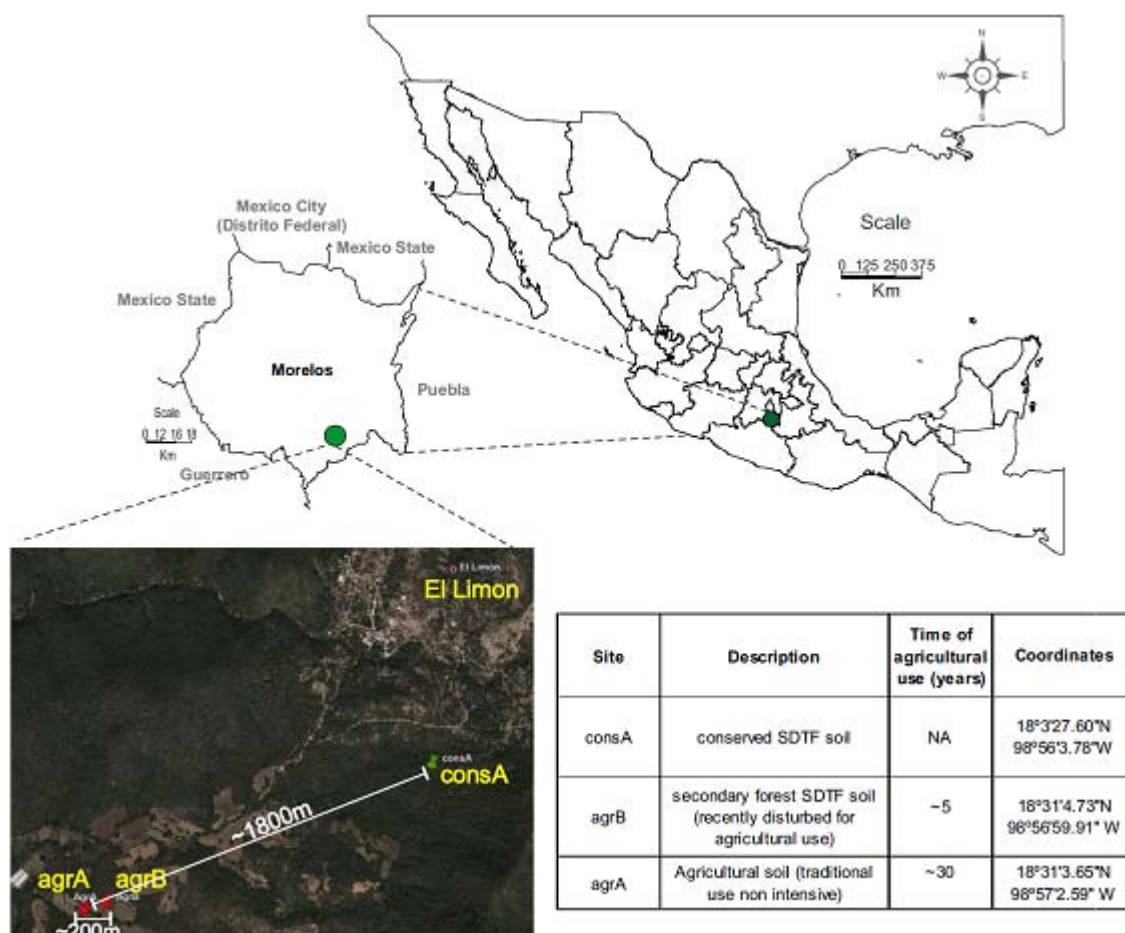


Fig. S1. Map showing the locations of the sampling sites in the SHBR in the Southern border of the State of Morelos, Mexico.

1. Description and location of the sampling sites (cont.)

Table S1. Physico-chemical analysis of the soil samples used in this study

	Site				Method of extraction	Method of quantification
	consA	agrB	agrA	Units		
pH	5.1	5.93	5.76	Not applicable		
Texture	Sandy Clay Loam	Sandy Clay Loam	Sandy Clay Loam	Not applicable		(1 : 2 water) 25°C
Organic Mater	1.88	3.03	1.21	%	Walkey & Black	Titration
N-NO₃	0	10.82	4.27	mg kg ⁻¹	KCl 2N	Cadmium column
P-Bray	4.93	9.17	4.15	mg kg ⁻¹	Olsen solution	Colorimetric
K	461.63	277.41	115.91	mg kg ⁻¹	Bray solution	Colorimetric
Ca	5100.56	5425.79	4311.85	mg kg ⁻¹	NH ₄ (CH ₃ COO) 1N pH 7	Atomic absorption spectrometry
Mg	684.68	565.81	629.56	mg kg ⁻¹	NH ₄ (CH ₃ COO) 1N pH 7	Atomic absorption spectrometry
Na	0	0	22.06	mg kg ⁻¹	NH ₄ (CH ₃ COO) 1N pH 7	Atomic absorption spectrometry
S-SO₄	15	20.54	14.74	mg kg ⁻¹	NH ₄ (CH ₃ COO) 1N pH 7	Atomic absorption spectrometry
Fe	15.60	15.08	12.80	mg kg ⁻¹	Ca ₃ (PO ₄) ₂ solution	Turbidimetry
Cu	0.22	0.53	1.52	mg kg ⁻¹	DTPA	Atomic absorption spectrometry
Zn	0.55	0.44	0.37	mg kg ⁻¹	DTPA	Atomic absorption spectrometry
Mn	15.60	32.40	29.50	mg kg ⁻¹	DTPA	Atomic absorption spectrometry
B	0.37	0.44	0.22	mg kg ⁻¹	CaCl ₂	Colorimetric

2. Validation of the trapping approach as an efficient means to recover rhizobial diversity without strong bias

Recovering large numbers of rhizobial strains directly from field-grown plants is a difficult task for shrub or tree legumes. Trapping rhizobia under laboratory conditions with selected host plants and test soils is the more practical alternative. However, this strategy may bias the diversity of rhizobia recovered (Bala *et al.*, 2001; Alberton *et al.*, 2006; Ehinger *et al.*, 2014). We set up an experiment to quantify the potential bias using the Negro Xamapa (Nxam) and Rojo colorado (Rcol) bean cultivars by comparing the frequencies of the rhizobial species recovered by laboratory vs. field-grown plants at the agrA and agrB sites (Description of the sites is in Fig. S1 and Table S1).

Soil from the agricultural sites (agrA and agrB) was taken to the laboratory for a trapping experiment using three different inoculation methods of Nxam and Rcol seedlings: a) using 2ml of soil dilution (2g of soil diluted in 8 mL of nutrient solution (10% w/v N-free Norris solution)), b) 2g of soil and c) both (2g of soil and 2mL of soil dilution). In parallel, ten Nxam and ten Rcol bean plants were grown in the agrA and agrB sites (Fig. S1), and were harvested at 21 days post planting. A total of 101 isolates were recovered from all inoculation methods, including strains recovered directly from field-grown bean plants. A list of the recovered isolates is presented in Table S2. Eight species were identified based on phylogenetic analysis of *recA* sequences. Mosaic plots (Chi-squared test visualization tool) revealed no strong differences (p -value = 0.0268) in the diversity of rhizobial strains recovered from the different inoculation methods, nor between laboratory- and field-grown plants (Fig. S2). An α cut-off value of 0.01 was chosen because the dominant nodule lineages (3 lineages, $n > 14$) were recovered from all inoculation methods without significant frequency deviations from the expected values. Moderately significant differences were found only for numerically minor lineages (5 lineages, $n < 6$). The inoculation method chosen for the following trapping experiments consisted of adding 2 gr of soil plus 2 mL of soil-dilution (2 gr/8 mL), which allowed the recovery of 7 out of the 8 nodule lineages detected.

Therefore, we concluded that the trapping strategy was suitable to recover a representative sample of rhizobial diversity from the selected study sites, particularly for the dominant species associated with common bean.

Seedling inoculation procedure:

Germinated seedlings were inoculated with 2gr of soil and 2 mL of a suspension of 2g of soil diluted in 8mL of nutrient solution (10% w/v N-free Norris solution), planting three seedlings per pot. Six pots per site and host were cultivated in a growth chamber with a 12hr light/darkness cycle at 30°C/24°C. The *P. vulgaris* seeds were surface sterilized following standard procedures, while *Acacia* spp. seeds were previously scarified with H₂SO₄ as previously described, with a reduction to 3 min in the acid treatment (Vinuesa *et al.*, 1998). Rhizobia were isolated from surface-sterilized nodules (3% NaClO, 3 min.) excised from *Phaseolus* and *Acacia* plants grown for three and six weeks, respectively, as previously described (Vinuesa *et al.*, 1998).

2. Validation of the trapping approach as an efficient means to recover rhizobial diversity without strong bias (cont.)

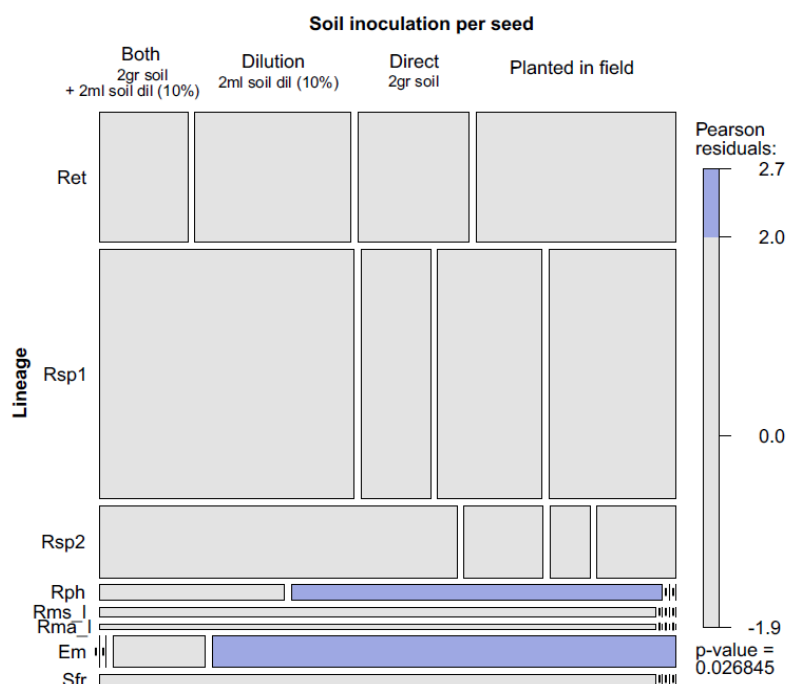


Fig. S2. Mosaic plot of the multi-way Chi-square test of the soil inoculation method and the lineage recovered from nodules. The test was not significant at $\alpha=0,01$ (p -value =0.026845). The shading reflects the magnitude of the Pearson residuals.

Table S2. Recovery of rhizobia *recA* sequences from agricultural sites under different methods of soil inoculation per seed.

Lineages	Site	Both (2gr soil +2ml soil dil*)		Dilution (2ml soil dil)		Direct soil (2gr soil)		Planted in field		Total
		N.Xamapa	R.colorado	N.Xamapa	R.colorado	N.Xamapa	R.colorado	N.Xamapa	R.colorado	
Ret	agrA	0	2	0	3	0	4	4	2	23
	agrB	0	2	1	3	1	0	3	0	
Rph	agrA	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	agrB	1	0	2	0	0	0	0	0	
Rsp1	agrA	3	5	3	0	2	2	1	3	48
	agrB	8	6	3	0	3	2	4	3	
Rsp2	agrA	6	3	0	2	1	0	1	0	14
	agrB	0	0	0	0	0	0	0	1	
Rms_I	agrA	0	1	0	0	0	0	0	0	2
	agrB	1	0	0	0	0	0	0	0	
Rma_I	agrA	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	agrB	0	1	0	0	0	0	0	0	
Em	agrA	0	0	0	0	0	1	0	0	6
	agrB	0	0	0	0	0	0	2	3	
Sfr	agrA	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	agrB	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total		21	20	9	8	7	9	15	12	101

* Soil dilution 10% w/v N-free Norris solution

3. Isolation of rhizobia from the root surfaces of common bean and *Acacia* plants

After nodule removal, root systems were washed with tap water until no conspicuous soil aggregates were left. 5g of roots per treatment were cut in sections of ~1cm, including root tips and old roots, and placed in sterile Falcon tubes containing 25mL of a sterile isolation solution (10mM MgSO₄ and 0.01% Tween 40). Tubes were incubated at room temperature for 30 min before vortexing at full power for 10 min. The root sections were removed and the solution was allowed to sediment for 1h. Serial dilutions of the solution were plated on glucose-based rhizobium-defined medium (GRDM) (Sachs *et al.*, 2009), minimal medium with lactose (MM-lac) (Segovia *et al.*, 1991), and PY nal20. All media contained cycloheximide (100mg/L) as antifungal agent. Plates were incubated at 30°C.

PCR-based molecular identification assay for root-associated Rhizobiaceae

An extra validation of root-surface isolates was performed by *recA* amplification with the *Rhizobiaceae*-specific primers 64F/640R and *glnII* amplification using primers 12F/689R (Vinuesa *et al.*, 2005a). The latter locus is found only in a few bacterial lineages, but is conserved in rhizobia and has been used as a phylogenetic marker for this group (Turner and Young, 2000; Vinuesa *et al.*, 2005b; Vinuesa *et al.*, 2005a). Only isolates positive for the amplification of both markers were further analyzed.

4. Statistical analysis of the diversity of root-surface rhizobia isolated from *Acacia* and bean plants, as conditioned by isolation medium

A total of 296 strains were recovered from root surfaces using the following isolation media: GRDM: 61; MM-Lac: 75; PYnal20: 160. Multiway Chi-square tests, represented as mosaic plots (Fig. S3), revealed that only the recovery of *R. etli* (Ret) and *R. hainanense* complex (Rha_c) from *Acacia* spp. hosts is significantly dependent on isolation medium (p -value= $6.3218e^{-06}$). MM-Lac favoured the isolation of Rha_c and PYnal20 that of Ret. Interestingly those biases are not observed in *P. vulgaris* hosts (p -value =0.066304).

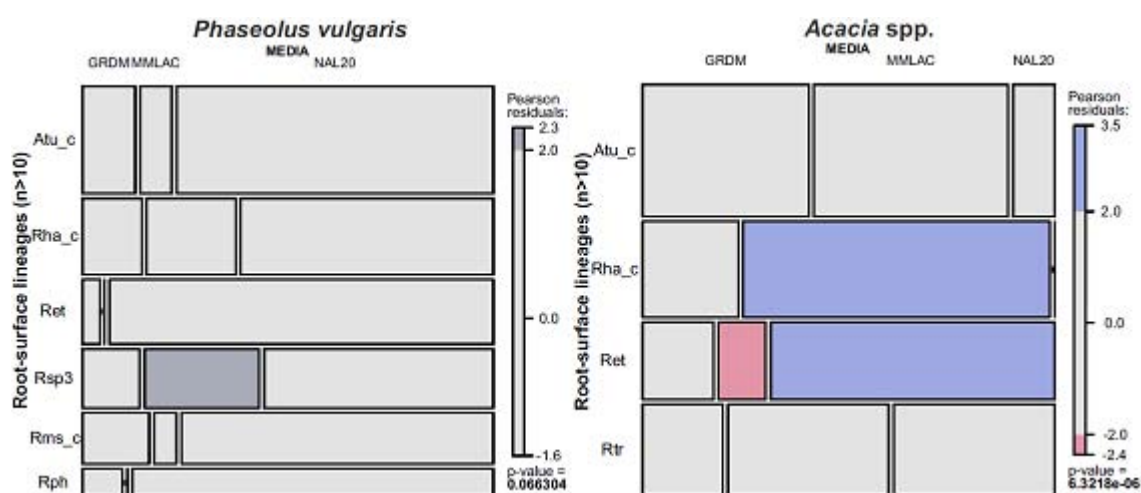


Fig. S3. Mosaic plots summarizing multi-way Chi-square tests of the independence of root-surface rhizobial lineages from isolation medium for each host. The tests were performed only for lineages with >10 isolates per host. For *P. vulgaris* the test was not significant at $\alpha=0,05$ (p -value = 0.066304), but significant for *Acacia* spp. (p -value= $6.3218e^{-06}$). Mosaics are shaded by the magnitude of the Pearson residuals, as shown on the scale on the right. The lineage labels are specified in (Fig. 2A and Table S5)

5. Selection of the *recA* gene for rhizobial taxonomic assignments and diversity estimation

The GenBank nucleotide sequence database was queried on October 20th, 2012, and January 24th, 2015, via the ENTREZ system to retrieve all *Rhizobium spp.* gene fragments having at least 50 sequences \geq 450bp long, excluding entries corresponding to genome sequences. These sequences were analyzed with the goal of identifying the core-genome locus having the largest number of reference sequences corresponding to taxonomically labelled *Rhizobium* species, for phylogenetic analyses. Figure S4 summarizes the search results. In January 2015, 25 loci were found to contain at least 50 sequences (Figure S4A), *recA* being the locus with both the largest total number of sequences ($n=1339$) and the largest number ($n=57$) of taxonomically labeled sequences (Figure S4B). The same trend was observed for this locus in the 2012 search (data not shown), when the *recA* gene was chosen as the marker for our phylogenetic and sequence-based diversity analyses.

Analysis of 25 potential markers retrieved from GenBanks via ENTREZ querying, reveals *recA* as the marker with the largest number of reference sequences available for rhizobial taxonomic assignment of environmental sequences.

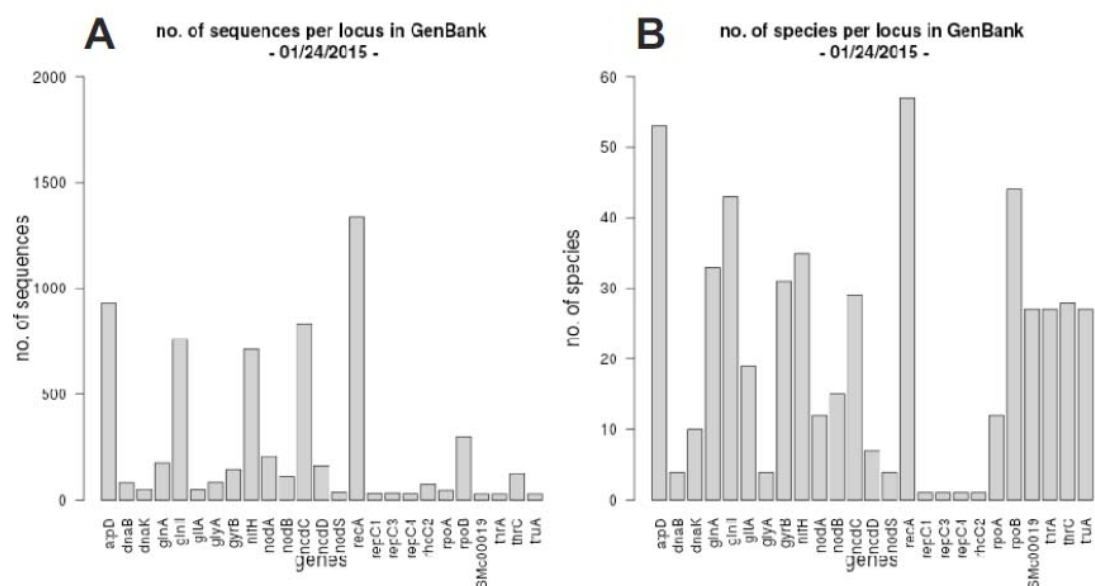
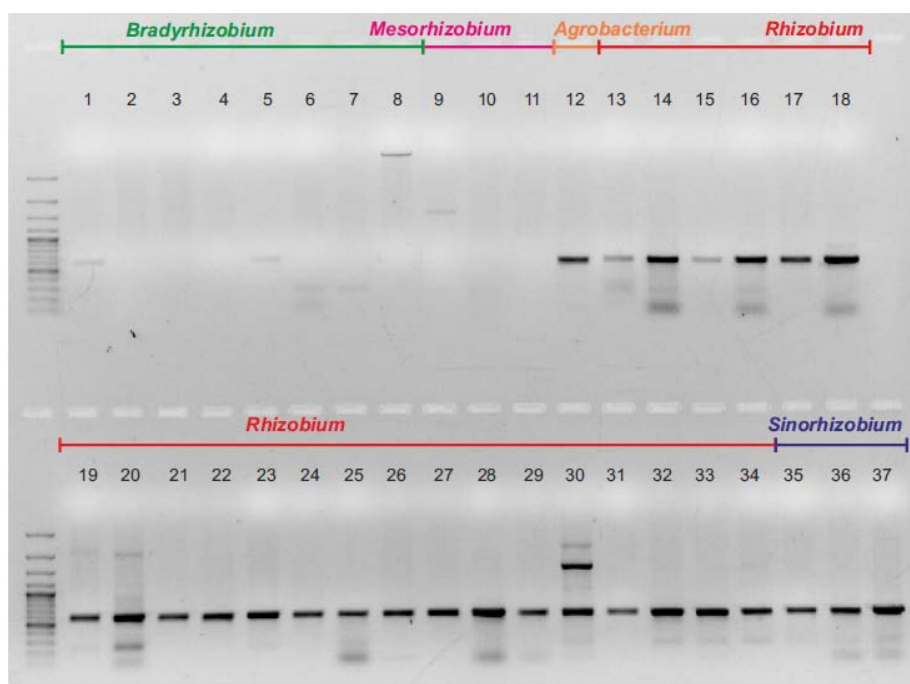


Fig. S4. *recA* is the marker chosen for our phylogenetic and sequence-based diversity analyses. Inset A shows the number of sequences per locus found in GenBank database and inset B the number of species per locus in a query run on 01/24/2015.

6. Analysis of the taxonomic specificity and coverage of the *recA*-64F/*recA*-640R primer set targeting the *Rhizobiaceae*

Figure S5 depicts a stained agarose gel showing the amplicons generated from selected reference strains with the primer pair *recA*-64F/*recA*-640R, that specifically targets members of the family *Rhizobiaceae*. In our clone libraries of soil amplicons generated with these primers we found only the following 6 non-*Rhizobiaceae* sequences, belonging to genera of the order *Rhizobiales*: Family *Methylobacteriaceae*: *Microvirga* 1, *Metylobacterium* 3 (both genera contain described root nodule bacteria). Family *Methylocystaceae*: *Methylocystis* 1; Family *Phyllobacteriaceae*: *Mesorhizobium* 1. This demonstrates the high specificity of the *recA*-64F/*recA*-640R primer set.



1 <i>B. canariense</i> BC-C2	8 <i>B. yuamingense</i> CCB AU 10071	15 <i>R. etli</i> CFN42	22 <i>R. gallicum</i> IE4868	30 <i>R. huautlense</i> S130
2 <i>B. elkanii</i> USDA31	9 <i>M. amorphae</i> ACCC19665	16 <i>R. phaseoli</i> CIAT652	23 <i>R. gallicum</i> IE2735	31 <i>R. huautlense</i> S145
3 <i>B. elkanii</i> USDA46	10 <i>M. plurifarium</i> ORS1002	17 <i>R. phaseoli</i> CIAT894	24 <i>R. gallicum</i> IE1006	32 <i>R. huautlense</i> SO2
4 <i>B. japonicum</i> DSM30131	11 <i>A. tumefaciens</i> C58	18 <i>R. phaseoli</i> GR56	25 <i>R. gallicum</i> GR18	33 <i>R. leguminosarum</i> VF-39
5 <i>B. japonicum</i> USDA122	12 <i>R. galegae</i> HAMI 2578	19 <i>R. phaseoli</i> IE4771	26 <i>R. gallicum</i> GR42	34 <i>R. tropici</i> CIAT899
6 <i>B. lianinense</i> LM18230	13 <i>R. phaseoli</i> 8-C3	20 <i>R. phaseoli</i> KIM5	27 <i>R. gallicum</i> USDA2918	35 <i>S. fredii</i> GR64
7 <i>Bradyrhizobium</i> sp. Spr7-9	14 <i>R. phaseoli</i> Brasil5	21 <i>R. phaseoli</i> Mim-2	28 <i>R. gallicum</i> IE2751	36 <i>S. fredii</i> USDA205
			29 <i>R. huautlense</i> S128	37 <i>S. meliloti</i> 1021

Fig. S5. Coverage and specificity analysis of the *Rhizobiaceae*-specific *recA* primer pair 64F/640R. Amplification of a 600nt-long *recA* fragment using primer pair 64F and 640R was only effective with *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* reference strains, the main rhizobial genera in the *Rhizobiaceae* family.

7. Overview of the number of *recA* sequences per host, habitat and site obtained in this study

The numbers of isolates recovered for each host x habitat x site combination are shown in Table S3. We tried to obtain at least 20 isolates from each treatment, but this was not always possible due to the poor nodulation observed for some host/site combinations, which was most marked for *A. farnesiana* inoculated with soil from site agrA.

Table S3. Number of the rhizobial *recA* sequences obtained in this study by culture-dependent and independent approaches, by host, habitat and sampling site.

	Legume	Habitat	Soil			Total
			Conserved A (consA)	Agricultural B (agrB)	Agricultural A (agrA)	
Culture-dependent approach	<i>P. vulgaris</i> (Negro Xamapa)	Nodule	25	29	23	77
		Root-surface	37	21	18	76
	<i>P. vulgaris</i> (Rojo colorado)	Nodule	33	21	28	82
		Root-surface	34	20	27	81
	<i>A. cochliacantha</i>	Nodule	19	22	18	59
		Root-surface	27	22	20	69
	<i>A. farnesiana</i>	Nodule	24	24	2 ^a	50
		Root-surface	24	23	23	70
Culture-independent approach ^b		Library	202	118	93	413
Total			425	300	252	977

^aThese sequences correspond to the total of nodules recovered from that legume-soil combination.

^bIn addition to the 6 non-*Rhizobiaceae* sequences mentioned in the previous section, 4 chimeric sequences were detected and 14 sequences were removed because of the notoriously long branches they produced.

8. Reference *recA* sequences used for phylogenetic classification of the clone library and isolate sequences generated in this study

Table S4. Reference *recA* sequences (n=46) retrieved from GenBank, used for phylogenetic classification of the *recA* sequences generated in this study. Strains with a T are type strains.

Accession number	Bacterial strain
FM164330	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58
BA000040	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 ¹
HM997099	<i>Ensifer adhaerens</i> ATCC 33212 ¹
DQ411951	<i>E. mexicanus</i> ITTG R7 ¹
BA000012	<i>Mesorhizobium huakuii</i> MAFF303099
AY494824	<i>M. plurifarum</i> ICMP 13640 ¹
FR772466	<i>Rhizobium alarii</i> R 45988
HM142767	<i>R. endophyticum</i> CCGE 2052 ¹
CP000133	<i>R. etli</i> CFN 42 ¹
CP001074	<i>R. phaseoli</i> CIAT 652
CP005950	<i>R. etli</i> Mim1
EF579941	<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ¹
AM182127	<i>R. galegae</i> LMG 6214 ¹
HQ735070	<i>R. gallicum</i> FL27
EU488823	<i>R. gallicum</i> R602 ¹
EU488819	<i>R. giardinii</i> H152 ¹
JF424622	<i>R. grahamii</i> CCGE 502T
JF424623	<i>R. grahamii</i> Cli80
HM047132	<i>R. hainanense</i> CCBAU 57015 ¹
EU622118	<i>R. huautlense</i> CCBAU 65798
EU488811	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2671
EU488817	<i>R. leucaenae</i> CFN299 ¹
EU488826	<i>R. leucaenae</i> PRF 35
HQ735076	<i>R. loessense</i> LMG 21975 ¹
JF424621	<i>R. mesoamericanum</i> CCG 503
EU034028	<i>R. mesosinicum</i> CCBAU 41044
HQ735071	<i>R. mongolense</i> USDA1 92
EF490029	<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ¹
AY907464	<i>R. phaseoli</i> IE4771
AAX86852	<i>R. phaseoli</i> KIM5s
EF113134	<i>R. pisi</i> DSM 30132 ¹
JN636817	<i>R. sp</i> LPU 83
HE687280	<i>R. sp</i> NGR181
FJ816279	<i>R. sullae</i> IS123 ¹
HQ735075	<i>R. tibeticum</i> LMG 24453 ¹
EU488815	<i>R. tropici</i> CIAT 899 ¹
EU622122	<i>R. vallis</i> CCBAU 65751
GU128902	<i>R. vignae</i> CCBAU 05176 ¹
FJ970376	<i>Sinorhizobium americanum</i> 36m
DQ411943	<i>S. americanum</i> CFNEI 1 ¹
JN034673	<i>S. fredii</i> GR64
CP001389	<i>S. fredii</i> NGR 234
CP003563	<i>S. fredii</i> USDA 257
CP000738	<i>S. medicae</i> WSM419
AL591688	<i>S. meliloti</i> 1021
AM182153	<i>S. terangaiae</i> LMG 7834 ¹

9. Phylogenetic classification of all *recA* sequences generated in this study.

Table S5. Classification of rhizobial *recA* sequences by sampling site, habitat and legume genus*, based on the ML phylogeny shown in Fig. 2 of the main text.

Lineage	Site	Nodule		Root-surface		Soil (library)
		Acacia	Bean	Acacia	Bean	
<i>Rhizobium etli</i> (Ret)	consA	6(2,4)	5(2,3)	4(0,4)	0	69
	agrB	31(14,17)	10(5,5)	13(6,7)	9(5,4)	64
	agrA	9(9,0)	15(4,11)	0	14(9,5)	12
<i>R. phaseoli</i> (Rph)	consA	4(1,3)	3(2,1)	3(3,0)	3(3,0)	9
	agrB	1(0,1)	3(3,0)	1(0,1)	3(1, 2)	2
	agrA	0	0	0	4(1,3)	8
<i>R. leguminosarum</i> like (Rle_l)	consA	0	0	0	0	4
	agrB	0	0	0	0	0
	agrA	0	0	0	0	0
<i>R. vallis</i> complex (Rva_c)	consA	11(8,3)	0	8(7,1)	0	11
	agrB	0	0	2(0,2)	0	3
	agrA	0	0	0	0	1
<i>Rhizobium</i> sp1 (Rsp1)	consA	8(3,5)	37(14,23)	5(0,5)	0	1
	agrB	4(1,3)	29(18,11)	0	1(1,0)	4
	agrA	3(1,2)	19(9,10)	0	0	1
<i>Rhizobium</i> sp2 (Rsp2)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	1(0,1)	0	0	0
	agrA	2(2,0)	13(8,5)	0	0	0
<i>R. hainanense</i> (Rha_c)	consA	0	1(0,1)	0	8(4,4)	0
	agrB	2(2,0)	0	10(5,5)	6(0,6)	0
	agrA	1(1,0)	0	11(10,1)	13(5,8)	5
<i>R. tropici</i> (Rtr)	consA	6(3,3)	0	18(10,8)	0	0
	agrB	0	0	0	0	0
	agrA	0	0	2(1,1)	0	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Atu_c)	consA	2(0,2)	7(4,3)	3(1,2)	36(9,27)	0
	agrB	0	0	0	0	0
	agrA	0	0	26(5,21)	2(1,1)	4
<i>Rhizobium</i> sp3 (Rsp3)	consA	0	2(2,0)	0	11(11,0)	0
	agrB	0	0	4(4,0)	5(5,0)	0
	agrA	0	0	0	5(0,5)	0
<i>R. alamii</i> (Ral_l)	consA	0	0	0	2(2,0)	1
	agrB	0	0	8(6,2)	3(1,2)	1
	agrA	0	0	1(1,0)	2(1,1)	0
<i>R. mesosinicum</i> like (Rms_l)	consA	1(1,0)	0	0	11(8,3)	19
	agrB	0	1(1,0)	2(1,1)	5(2,3)	17
	agrA	0	1(0,1)	2(2,0)	2(0,2)	32
<i>R. mesoamericaum</i> like (Rma_l)	consA	0	2(0,2)	1(0,1)	0	31
	agrB	0	1(0,1)	0	0	0

	agrA	0	0	0	0	0
<i>R. grahamii</i> complex (Rgr_c)	consA	0	0	0	0	23
	agrB	0	0	0	0	2
	agrA	0	0	0	0	0
<i>R. endophyticum</i> like (Ren_l)	consA	1(0,1)	0	0	0	5
	agrB	0	0	0	0	3
	agrA	0	0	0	0	18
<i>R. tibeticum</i> complex (Rti_c)	consA	0	0	0	0	16
	agrB	0	0	0	0	1
	agrA	0	0	0	0	4
<i>R. huautlense</i> like (Rhu_l)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	0	0	0	1
	agrA	0	0	0	0	0
<i>R. gallicum</i> - <i>R. sullae</i> complex (Rgasu_c)	consA	0	0	0	0	12
	agrB	0	0	0	0	0
	agrA	0	0	0	0	0
<i>Ensifer mexicanus</i> (Em)	consA	2(0,2)	1(1,0)	2(1,1)	0	1
	agrB	6(3,3)	5(2,3)	0	3(0,3)	1
	agrA	4(4,0)	1(0,1)	1(1,0)	1(0,1)	0
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (Sm)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	0	5(0,5)	0	1
	agrA	0	0	0	0	0
<i>Sinorhizobium</i> sp. (Ssp)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	0	0	0	0
	agrA	0	0	0	0	4
<i>S. fredii</i> (Sfr)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	0	0	0	18
	agrA	0	2(2,0)	0	0	4
<i>Ensifer adhaerens</i> complex (Ead_c)	consA	2(1,1)	0	7(5,2)	0	0
	agrB	2(2,0)	0	0	1(1,0)	0
	agrA	1(1,0)	0	0	1(1,0)	0
<i>Rhizobium</i> sp4 (Rsp4)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	0	0	5(5,0)	0
	agrA	0	0	0	0	0
Novel lineage (NL)	consA	0	0	0	0	0
	agrB	0	0	0	0	0
	agrA	0	0	0	1(0,1)	0

*The number of sequences recovered from 2 common bean cultivars (Negro Xamapa, Rojo colorado) or *Acacia* species (*A. cochliacantha*, *A. farnesiana*) is indicated in parenthesis.

10. Overview of the *recA* sequence numbers per lineage for nodule (A), root-surface isolates (B) and soil library clones (C) obtained in this study.

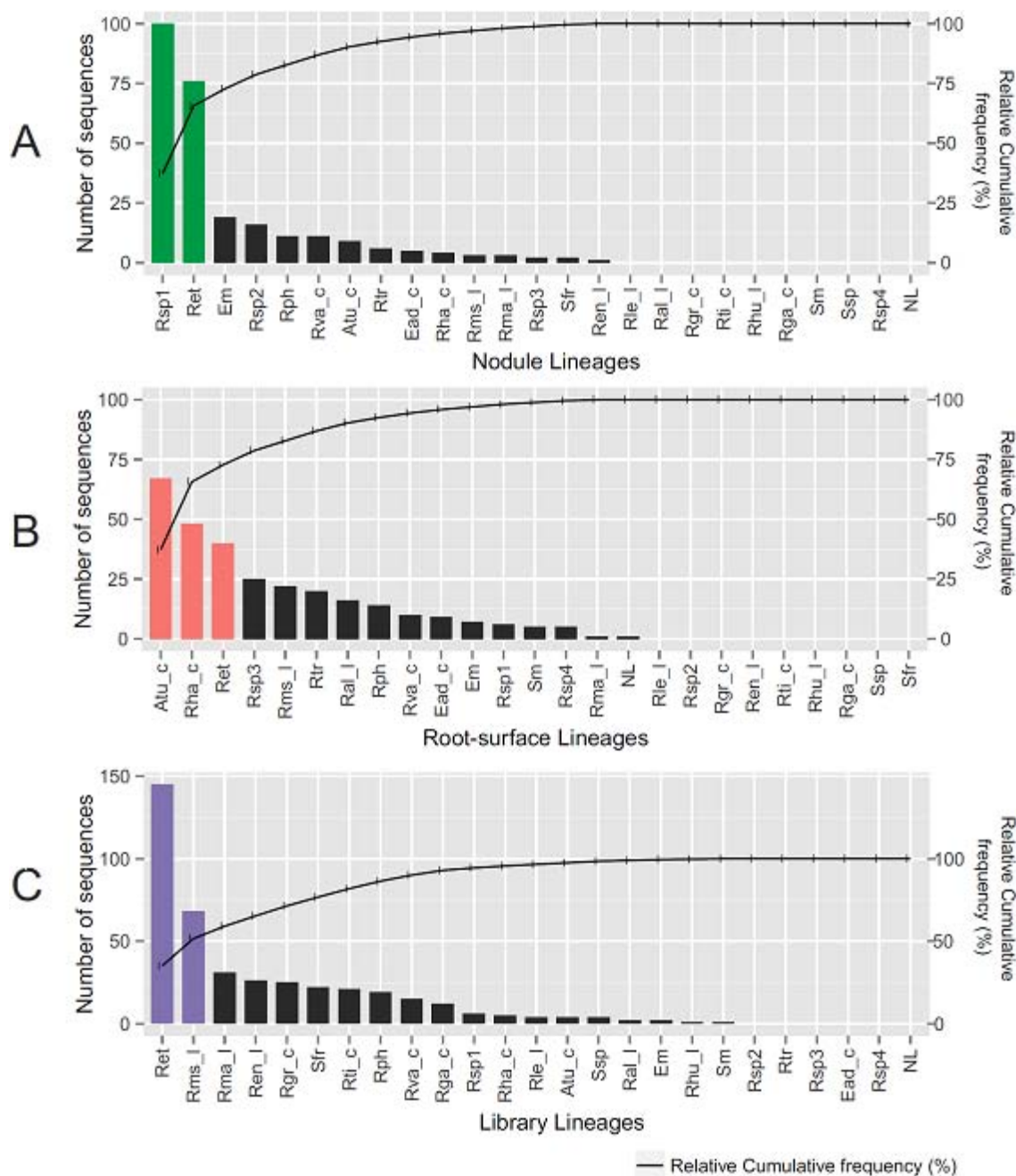


Fig. S6. Rank-abundance graphs of lineages recovered from nodules, rhizosphere and soil library. Each graph presents a barplot of the sorted abundances of each lineage and a curve of the relative cumulative frequency (%). Colored bars indicate the lineage whose cumulative sequences comprise $\geq 50\%$ of the total *recA* sequences recovered from a particular habitat.

11. Hierarchical Clustering of Principal Components (HCPC) performed to delimit clusters of lineages by habitats and hosts

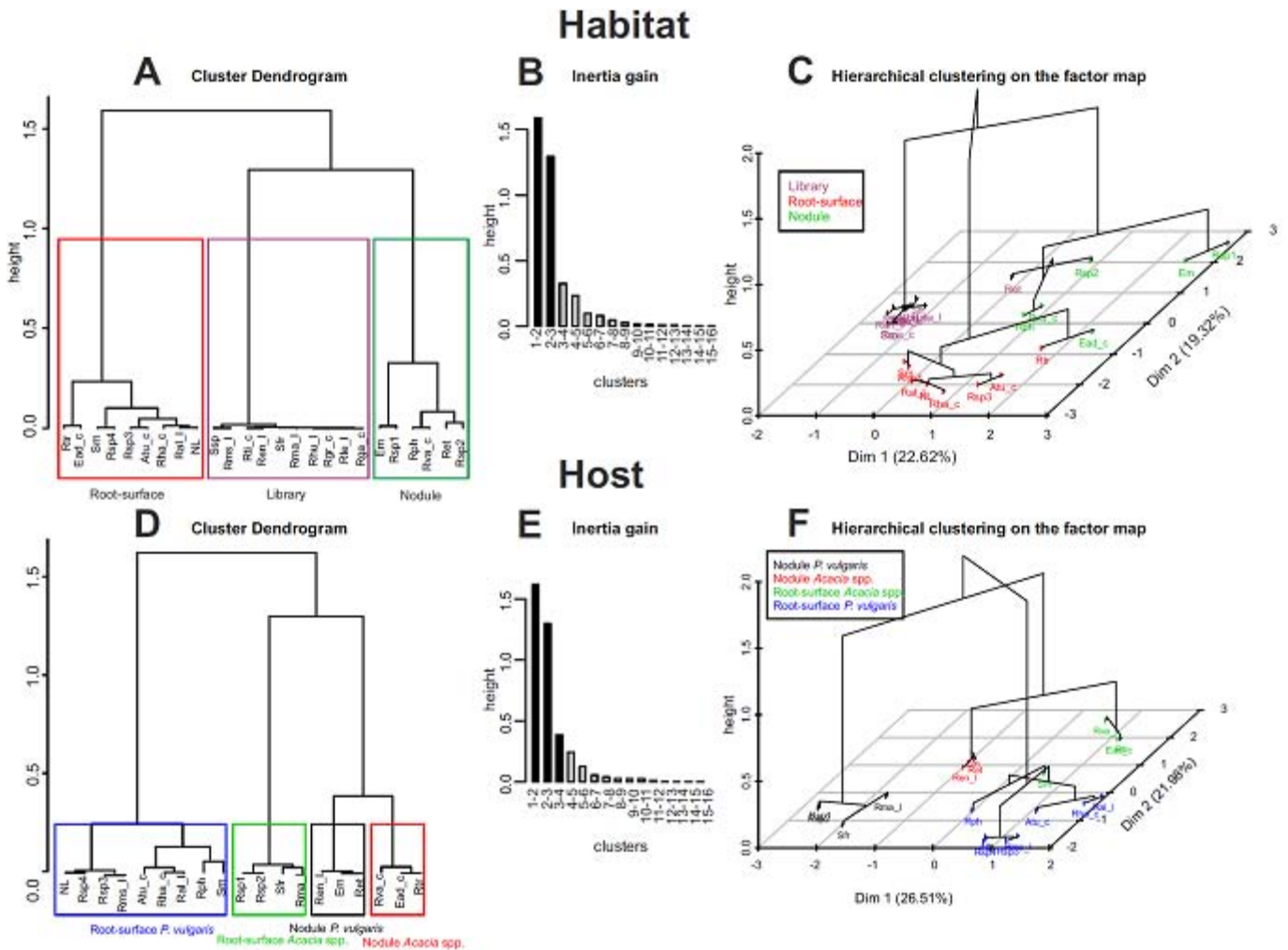


Fig. S7. Hierarchical Clustering of Principal Components (HCPC) of lineages by habitat and hosts. Insets A-C show the HCPC of lineages by habitats (bulk-soil, root-surface and nodule) and insets D-F show the HCPC of lineage by host (*Acacia* spp. and *P. vulgaris*). In both cases only the first two principal components are considered. Insets A and D are the cluster dendrograms generated by Ward's method. B and E are barplots that show the inertia gain in the cluster formation. B shows that there is strong support to group lineages in three clusters (habitat clusters), while the barplot in E shows that there is good evidence for 4 clusters of isolate lineages, according to habitat (nodule and root-surface) and host (acacias and common bean). Hierarchical clustering on the PCAs factor maps are displayed in insets C and F. The final clusters are colored by the k-means partitioning clustering performed in the analyses.

12. Analysis of the 3rd and 4th Principal Components of lineage distribution across habitats and site

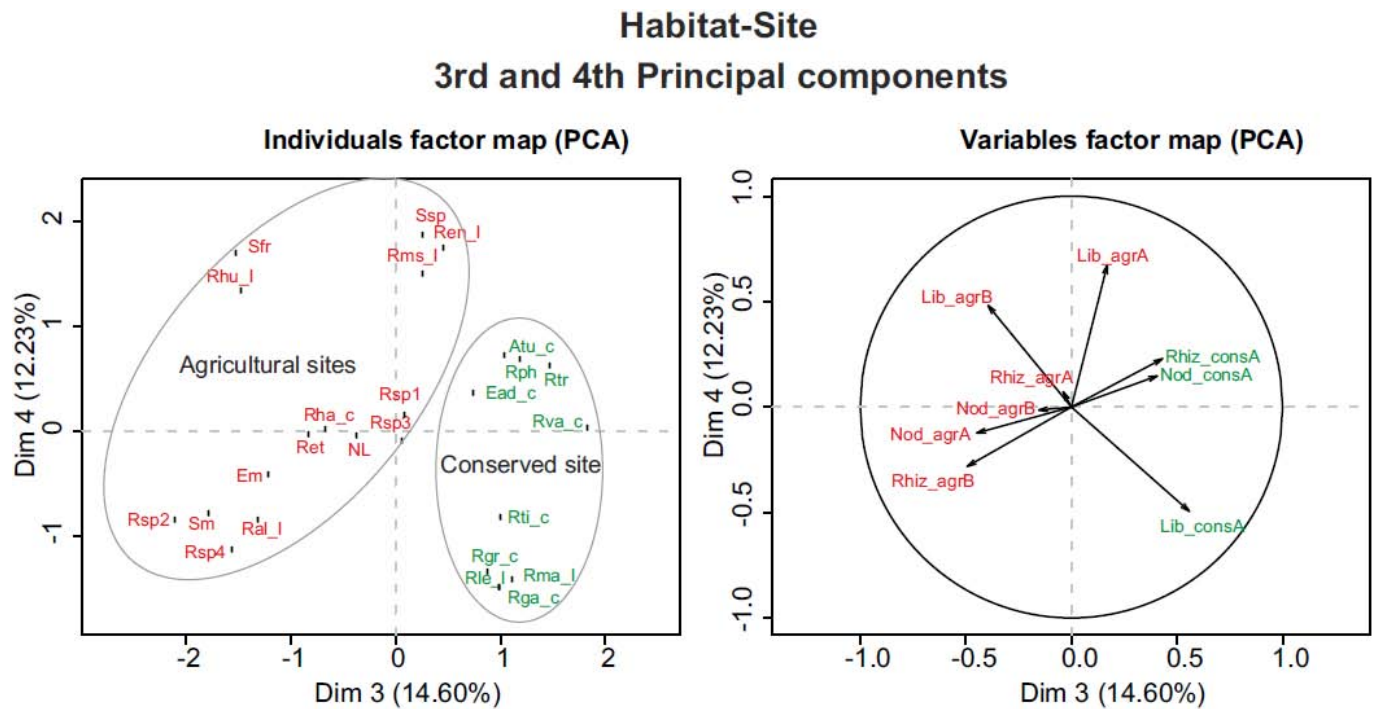


Figure S8. Principal component analysis (PCA) of lineage distribution across habitats and sites displayed for the third and fourth principal components. These (Dim3 and Dim4) are ordinated in xy-axes. The percentage contribution to the inertia (variance) of the lineages is shown in parenthesis. The lineages are plotted on the left-hand panel and the variables on the right one. Lineage labels and variables are colored and circled by their soil association (agricultural and conserved).

13. A graphical model for the diversity of *Rhizobiaceae* communities in soils, root surfaces and nodules of SDTF soils with different land usage in the SHBR.

Figure S9 depicts a graphical summary of the diversity patterns found in this study. The total *Rhizobiaceae* community recovered is represented by the large central triangle, which is divided in three sections, representing how the molecular diversity of *recA* lineages partitions among the explored habitats (numbers of the left side and Venn diagram to the right). The triangular structure of the model reflects the strong filtering exerted by the host legumes on the diversity of rhizobial communities, as these colonize the plant roots and nodules from the surrounding bulk soil. PC analysis revealed that rhizobial lineages are differentially represented in these “compartments” (Figure 3 of the main text). The host exerts a stronger influence on the community structure and richness than the sites (land usage) sampled in this study (Figures 3 and 4). Moreover, there were highly significant differences in the recruitment of symbiotic rhizobia by the host genera (Figure 4). *Ret* was the most abundant symbiotic lineage associated with *Acacia* spp. while *P. vulgaris* selected mainly for Rsp1 isolates (colored triangular inset).

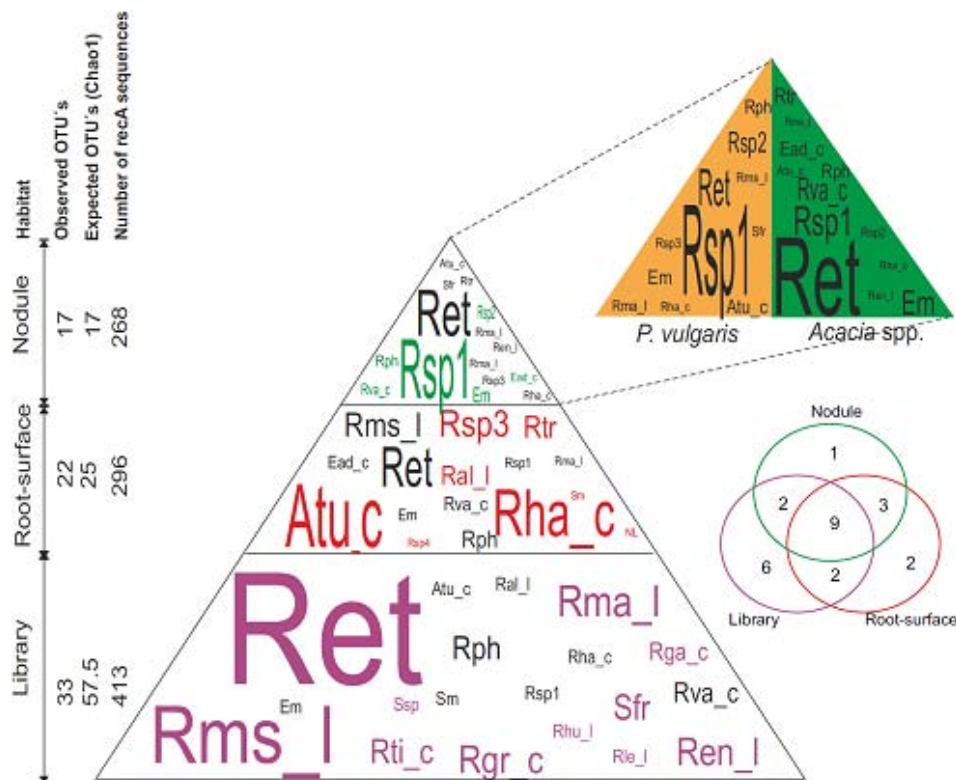


Figure S9. Structure of *Rhizobiaceae* communities in soils of SDTF at the SHBR. Schematic representation of the diversity patterns found in this study. The three habitats explored form part of a triangle that represents the whole *Rhizobiaceae* community. The left hand table depicts selected richness indices for each habitat, measured as the number of observed and expected OTUs (non-parametric Chao1 index). Each triangle compartment lists the lineages recovered from that habitat. The font size of lineage labels are proportional to their frequency of occurrence in each habitat, and are colored if they were predominantly recovered from that habitat (as PCAs revealed in Figure 3A). The top right inset represents the nodule habitat with a separation by host genus, listing in each division the recovered lineages. A Venn diagram shows that 9 phylogenetic lineages were recovered from all habitats, and the presence of habitat specific lineages (Note: these lineages were defined based on their placement on the maximum likelihood phylogeny shown in Fig. 2A of the main text, and don't perfectly overlap with the OTUs defined by clustering sequences at a similarity cut-off value of 94%).

14. *Rhizobium etli* (Ret) and *Rhizobium sp* (Rsp1) haplotypes recovered in this study**Table S6.** Haplotype assignation to *recA* sequences from clone-libraries and isolates classified as *Rhizobium etli* and *Rhizobium sp1* based on their placement on the ML phylogeny (Fig. 2A).

<i>Rhizobium etli</i> (Ret) haplotypes			
Haplotype	Number <i>recA</i> sequences /isolates	Strain/ <i>recA</i> -Clone	Accession number
Hap_16	37	AgrA_100, AgrA_118, AgrA_36, AgrA_71, AgrA_84, AgrA_9, AgrB_102, AgrB_104, AgrB_124, AgrB_125, AgrB_12, AgrB_133, AgrB_137, AgrB_144, AgrB_158, AgrB_163, AgrB_177, AgrB_179, AgrB_180, AgrB_181, AgrB_182, AgrB_188, AgrB_24, AgrB_28, AgrB_34, AgrB_40, AgrB_41, AgrB_42, AgrB_56, AgrB_58, AgrB_60, AgrB_68, AgrB_6, AgrB_80, AgrB_90, ROTB1_4f, ROTB2_5f	KR400227, KR400228, KR400230, KR400232, KR400234, KR400235, KR400240, KR400241, KR400249, KR400251, KR400252, KR400254, KR400256, KR400258, KR400260, KR400261, KR400266, KR400267, KR400268, KR400269, KR400270, KR400274, KR400276, KR400278, KR400281, KR400283, KR400284, KR400285, KR400289, KR400290, KR400291, KR400292, KR400294, KR400298, KR400302, KR400427, KR400428
Hap_6	28	ACOA4_12, ACOA4_8, ACOB2_10, ACOB3_11, ACOB3_3, ACOB4_36, AFAB2_10, AFAB2_12, AgrB_106, AgrB_110, AgrB_121, AgrB_134, AgrB_140, AgrB_69, NOT2C2_10, NSB2_1, NXA12_19, NXB3_1, RACOB_15, RACOB_3, RNOTB12, RNSA8, RSA9, RSA2_19, RSA2_2, RSA2_5a, RSA2_5bc, RNSA9	KR400186, KR400190, KR400196, KR400198, KR400201, KR400204, KR400220, KR400221, KR400243, KR400246, KR400250, KR400255, KR400257, KR400295, KR400374, KR400375, KR400376, KR400380, KR400383, KR400384, KR400417, KR400419, KR400420, KR400436, KR400438, KR400439, KR400440, KR400441
Hap_13	28	AFAB1_24, CA1b_34, CA1b_35, CA1b_43, CA1b_51, CA1b_53, CA1b_55, CA1b_56, CA2b_29, CA3b_12, CA3b_18, CA3b_20, CA3b_22, CA3b_25, CA3b_27, CA3b_29, CA3b_2, CA3b_31, CA3b_33, CA3b_62, CA3b_64, CA3b_66, CA3b_77, CA3b_79, CA3b_85, CA3b_89, CA3b_8, CA3b_95	KR400216, KR400307, KR400308, KR400313, KR400315, KR400316, KR400318, KR400319, KR400332, KR400334, KR400336, KR400337, KR400338, KR400340, KR400342, KR400343, KR400345, KR400347, KR400348, KR400355, KR400356, KR400357, KR400362, KR400363, KR400364, KR400368, KR400369, KR400371
Hap_3	25	ACOA2_3, ACOA4_3, ACOA4_5, ACOA4_6, ACOA4_9, ACOB1_8, ACOB3_14, ACOB3_6, ACOB4_50, AFAB1_26, AFAB3_13f, AgrB_26, AgrB_33, AgrB_66, NXA5_3, RACOB53f, RCA3_2, ROT2C1_2, ROTA2_11n, ROTA4_4, AgrB_186, RCA3_1, RDA1_6, RDA1_7b, RDA2_7	KR400183, KR400187, KR400188, KR400189, KR400191, KR400195, KR400199, KR400203, KR400205, KR400217, KR400223, KR400273, KR400277, KR400280, KR400293, KR400378, KR400387, KR400400, KR400401, KR400402, KR400403, KR400404, KR400422, KR400425, KR400426
Hap_7	22	ACOB1_20, ACOB1_2, ACOB3_4, AFAB1_17, AFAB1_1, AFAB1_20, AFAB2_1, AFAB3_15f, AFAB3_9f, AgrB_81, NDB2_2, NOT2C1_2, NXB5_4, RAFAB_20, RAFAB_21, RAFAB_5, RAFAB_6, RAFAB_7, ROT2C1_7, ROT2C2_6, RRSB10, RRSB12	KR400192, KR400193, KR400202, KR400210, KR400213, KR400214, KR400219, KR400224, KR400226, KR400299, KR400372, KR400373, KR400381, KR400391, KR400392, KR400393, KR400394, KR400395, KR400423, KR400424, KR400435, KR400437

Hap_18	10	AgrA_4, AgrB_51, RNDA11, RNDA12, RNDA5, RNDA8, RNDA9, RRDA10, RRDA5, RRDA9	KR400231, KR400287, KR400408, KR400409, KR400411, KR400412, KR400413, KR400429, KR400430, KR400431
Hap_10	9	AFA1C1_6, AFA2C1_4f, AFA2C1_5f, CA1b_27, CA2b_14, CA3b_6, RACOB51f, RAFAGC_8n, RAFANC_4	KR400206, KR400208, KR400209, KR400304, KR400330, KR400353, KR400386, KR400397, KR400399
Hap_2	8	ACO4C1_26, AFA2C1_2f, RACOB_5, RAFAB_12, RNDB7, RNDB9, RNSB11, RRDB6	KR400182, KR400207, KR400385, KR400389, KR400415, KR400416, KR400421, KR400432
Hap_11	8	AFAB1_10, AFAB1_16, AFAB1_7, AgrB_107, NXA6_1, NXB5_E2, RROTB11, RROTB10	KR400211, KR400212, KR400218, KR400244, KR400379, KR400382, KR400433, KR400434
Hap_5	5	ACOA4_11, ACOB2_22, CA1b_72, CA1b_80, RNDA4	KR400185, KR400197, KR400326, KR400327, KR400410
Hap_79	4	RDB1_4, RDB2_1, RNDB6, RDB2_4	KR400405, KR400406, KR400407, KR400414
Hap_41	3	AgrB_75, AgrB_76, AgrB_88	KR400296, KR400297, KR400301
Hap_62	3	CA3b_21, CA3b_76, CA3b_82	KR400339, KR400361, KR400366
Hap_60	2	CA2b_28, CA2b_41	KR400331, KR400333
Hap_61	2	CA3b_17, CA3b_80	KR400335, KR400365
Hap_68	2	CA3b_59, RACOB55f	KR400352, KR400388
Hap_1	1	ACO1C1_3	KR400181
Hap_4	1	ACOA2_5	KR400184
Hap_8	1	ACOB1_3	KR400194
Hap_9	1	ACOB3_15	KR400200
Hap_12	1	AFAB1_21	KR400215
Hap_14	1	AFAB2_9	KR400222
Hap_15	1	AFAB3_8f	KR400225
Hap_17	1	AgrA_147	KR400229
Hap_19	1	AgrA_78	KR400233
Hap_20	1	AgrA_94	KR400236
Hap_21	1	AgrA_95	KR400237
Hap_22	1	AgrA_98	KR400238
Hap_23	1	AgrB_105	KR400242
Hap_24	1	AgrB_109	KR400245
Hap_25	1	AgrB_10	KR400239
Hap_26	1	AgrB_114	KR400247
Hap_27	1	AgrB_118	KR400248
Hap_28	1	AgrB_13	KR400253
Hap_29	1	AgrB_149	KR400259
Hap_30	1	AgrB_167	KR400262
Hap_31	1	AgrB_168	KR400263
Hap_32	1	AgrB_169	KR400264
Hap_33	1	AgrB_170	KR400265
Hap_34	1	AgrB_183	KR400271
Hap_35	1	AgrB_185	KR400272
Hap_36	1	AgrB_189	KR400275
Hap_37	1	AgrB_29	KR400279
Hap_38	1	AgrB_35	KR400282
Hap_39	1	AgrB_47	KR400286
Hap_40	1	AgrB_52	KR400288
Hap_42	1	AgrB_84	KR400300
Hap_43	1	CA1b_13	KR400303

Hap_44	1	CA1b_32	KR400305
Hap_45	1	CA1b_33	KR400306
Hap_46	1	CA1b_37	KR400309
Hap_47	1	CA1b_39	KR400310
Hap_48	1	CA1b_40	KR400311
Hap_49	1	CA1b_41	KR400312
Hap_50	1	CA1b_48	KR400314
Hap_51	1	CA1b_54	KR400317
Hap_52	1	CA1b_57	KR400320
Hap_53	1	CA1b_58	KR400321
Hap_54	1	CA1b_59	KR400322
Hap_55	1	CA1b_60	KR400324
Hap_56	1	CA1b_63	KR400325
Hap_57	1	CA1b_6	KR400323
Hap_58	1	CA1b_81	KR400328
Hap_59	1	CA1b_84	KR400329
Hap_63	1	CA3b_23	KR400341
Hap_64	1	CA3b_28	KR400344
Hap_65	1	CA3b_30	KR400346
Hap_66	1	CA3b_37	KR400349
Hap_67	1	CA3b_44	KR400350
Hap_69	1	CA3b_61	KR400354
Hap_70	1	CA3b_68	KR400358
Hap_71	1	CA3b_70	KR400359
Hap_72	1	CA3b_72	KR400360
Hap_73	1	CA3b_83	KR400367
Hap_74	1	CA3b_91	KR400370
Hap_75	1	NXA12_2	KR400377
Hap_76	1	RAFAB_18	KR400390
Hap_77	1	RAFAGC_1f	KR400396
Hap_78	1	RAFAMC_5f	KR400398
Hap_80	1	CA3b_56	KR400351
Hap_81	1	RNSA1	KR400418
Rhizobium sp1 (Rsp1) haplotypes			
Haplotype	Number recA sequences /isolates	Strain/recA-Clone	Accession number
Hap_3	64	ACOB1_15, AFA2C1_7f, AFA2C3_10f, AFAA1_1, AFAA1_3, AFAB1_12, AFAB1_13, AgrB_154, NDA1_7, NDA1_8, NDA2_3, NDB1_3, NOTA2_11, NOTA3_10, NOTA3_12, NOTB2_13, NOTB4_8, NSA1_8a, NSA2_8, NSB1_5, NSB2_6, NX2C1_10, NX2C1_12, NX2C1_15, NX2C1_17, NX2C2_5, NX2C3_13, NX2C3_3, NX2C3_7, NX2C4_23, NXB5_9, R2C1_11, R2C1_13, R2C1_18, R2C1_1, R2C1_3, R2C1_4, R2C1_5, R2C1_6, R2C1_9, R2C2_15, R2C2_18, R2C3_12, R2C3_13, R2C3_15, R2C3_7, R2C4_11, R2C4_14, R2C4_5, R2C4_9, RAFAMC_8f, RCA1_1, RCA7_1, RCA8_1, RDB1_6, ROTA2_14, ROTA2_22,	KR400717, KR400719, KR400720, KR400723, KR400724, KR400725, KR400726, KR400729, KR400734, KR400735, KR400736, KR400737, KR400740, KR400741, KR400742, KR400744, KR400750, KR400751, KR400752, KR400754, KR400755, KR400756, KR400757, KR400758, KR400759, KR400762, KR400763, KR400766, KR400767, KR400768, KR400774, KR400776, KR400777, KR400778, KR400775, KR400779, KR400780, KR400781, KR400782, KR400783, KR400784, KR400785, KR400786, KR400787, KR400789, KR400790, KR400791, KR400793, KR400795, KR400796, KR400799, KR400802, KR400803, KR400804,

		ROTA2_23, ROTA2_4, ROTB2_17, ROTB2_1, ROTB2_9, RSA1_5a, RSA2_4 ^a	KR400807, KR400810, KR400811, KR400812, KR400813, KR400818, KR400817, KR400820, KR400821, KR400822
Hap_4	24	AFA2C1_36n, AFA3C1_2, AFAB1_6, NDB1_4, NDB2_1, NOTB1_10, NOTB2_19, NOTB2_23, NOTB2_4, NOTB2_7, NOTB4_2, NSB1_3, NX2C4_5, NXA5_1, NXB4_1, NXB5_2, RCB5_1, RCB6_2, RNOTB4, ROTA2_7, ROTB1_10, ROTB2_7, RSB1_2, RSB1_5	KR400718, KR400722, KR400727, KR400738, KR400739, KR400743, KR400745, KR400746, KR400747, KR400748, KR400749, KR400753, KR400769, KR400770, KR400771, KR400773, KR400805, KR400806, KR400808, KR400814, KR400815, KR400819, KR400823, KR400824
Hap_1	14	ACO2C1_17f, ACO2C1_9f, ACOA4_1, AFA2C3_27f, AgrB_73, CA2b_23, NX2C1_6, NX2C2_3, NX2C3_20, NX2C3_21, NXB5_1, R2C4_12, RAFANC_3f, ROT2C1_6	KR400713, KR400715, KR400716, KR400721, KR400732, KR400733, KR400760, KR400761, KR400764, KR400765, KR400772, KR400792, KR400800, KR400809
Hap_2	1	ACO2C1_18	KR400714
Hap_5	1	AgrA_48	KR400728
Hap_6	1	AgrB_176	KR400730
Hap_7	1	AgrB_70	KR400731
Hap_8	1	R2C3_14	KR400788
Hap_9	1	R2C4_2	KR400794
Hap_10	1	RAFAGC_4f	KR400797
Hap_11	1	RAFAMC_6f	KR400798
Hap_12	1	RAFANC_9f	KR400801
Hap_13	1	ROTB1_40f	KR400816

15. Analysis of ecological specialization of rhizobial lineages for host root-surface colonization at species and haplotype levels

Table S7. Distribution by habitat of the most abundant Ret haplotypes and associated Paired Difference Index values of ecological specialization.

Haplotype*	Haplotype frequencies per habitat					PDI _{HAP} **
	Soil (145)	Root-surface (40)	Nodule (76)	Nodule		
				<i>Acacia</i> spp. (46) PDI _H =0,812	<i>P. vulgaris</i> (30) PDI _H =0,862	
Hap_3	4	1	20	11	9	0,181
Hap_6	6	6	16	8	8	0
Hap_7	1	7	14	9	5	0,444
Hap_11	1	2	5	3	2	0,333
Hap_10	3	3	3	3	0	1
Hap_16	35	0	2	0	2	1
Hap_79	0	1	3	0	3	1

The total number of *recA* sequences/isolates per habitat is indicated in parenthesis

*Total Re haplotypes= 81, total symbiotic haplotypes=18.

**All PDIs estimations were significant ($p < 0.001$ at 99.9% confidence limit).

PDI_H=Paired Difference Index for host. PDI_{HAP}= Paired Difference Index for haplotype.

Table S8. Distribution by habitat of the most abundant Rsp1 symbiotic haplotypes and associated Paired Difference Index values of ecological specialization.

Haplotype*	Haplotype frequencies per habitat					PDI _{HAP} **
	Soil (6)	Root-surface (6)	Nodule (100)	Nodule		
				<i>Acacia</i> spp. (15) PDI _H =0,809	<i>P. vulgaris</i> (85) PDI _H =0,909	
Hap_3	1	1	60	7	53	0,872
Hap_4	0	1	22	3	19	0,850
Hap_1	2	1	11	4	7	0,428

The total number of *recA* sequences/isolates per habitat is indicated in parenthesis.

*Total Rsp1 haplotypes= 13, total symbiotic haplotypes=7.

**All PDIs estimations were significant ($p < 0.001$ at 99.9% confidence limit).

PDI_H=Paired Difference Index for host. PDI_{HAP}= Paired Difference Index for haplotype.

Table S9. Absolute isolation frequency of lineages from nodules by host and their Paired Difference Index (for Lineage and Host) of ecological specialization

Symbiotic lineage	Acacia PDI _{Acacia} =0,902*	Bean PDI _{Phaseolus} =0,938*	PDI _{Lineage}
Ret	46	30	0,348*
Rph	5	6	0,167*
Rva_c	11	0	1*
Rsp1	15	85	0,824*
Rsp2	2	14	0,857*
Rha_c	3	1	0,667*
Rtr	6	0	1*
Rsp3	0	2	1*
Atu_c	2	7	0,714*
Rms_l	1	2	0,500*
Rma_l	0	3	1 ^{NA}
Ren_l	1	0	1 ^{NA}
Em	12	7	0,417*
Sfr	0	2	1*
Ead_c	5	0	1*

*PDIs estimations were significant ($p < 0.001$ at 99.9% confidence limit).

NA, significance test is not applicable.

Table S10. Absolute isolation frequency of lineages from root-surface isolates by host and their Paired Difference Index (for Lineage and Host) of ecological specialization

Root-surface lineage	Acacia PDI _{Acacia} =0,747	Bean PDI _{Phaseolus} =0,791	PDI _{Lineage}
Atu_c	29	38	0,237*
Rha_c	21	27	0,222*
Ret	17	23	0,260*
Rsp3	4	21	0,809*
Rms_c	4	18	0,777*
Rtr	20	0	1*
Ral_l	9	7	0,222*
Rph	4	10	0,600*
Rva_c	10	0	1*
Ead_c	7	2	0,714*
Rsp1	5	1	0,800*
Em	3	4	0,250*
Rsp4	0	5	1*
Sm	5	0	1*
NL	0	1	1 ^{NA}
Rma_l	1	0	1 ^{NA}

*PDIs estimations were significant ($p < 0.001$ at 99.9% confidence limit).

NA, significance test is not applicable.

16. Population tree of Rsp1 haplotypes and their frequency of occurrence by site, habitat, and host

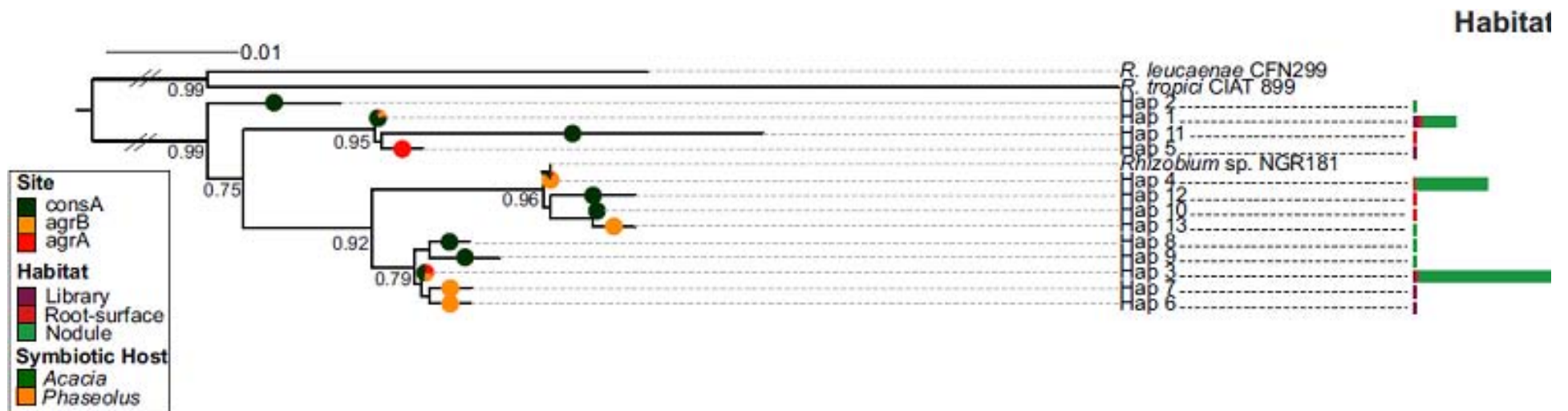


Fig. S10. Population tree (ML-phylogeny under the GTR+I+G model) for *Rhizobium* sp. 1 (Rsp1) based on *recA* haplotypes (n=13) and their frequency of occurrence by site, habitat, and host. The pie-charts on the branches indicate the relative frequency of the haplotype from the isolation sites. The first barplot indicate the frequency of recovery of the haplotypes from the sampled habitats (bulk-soil library, root-surface and nodule). The second barplot column shows the partitioning of nodule isolates by host. The haplotype 4 (Hap_4) has the same *recA* allele as the *Rhizobium* sp. NGR181 reference strain (Elliott et al., 2009). The most abundant symbiotic haplotypes are marked with stars. Figure was generated with iTOL (Letunic and Bork, 2011).

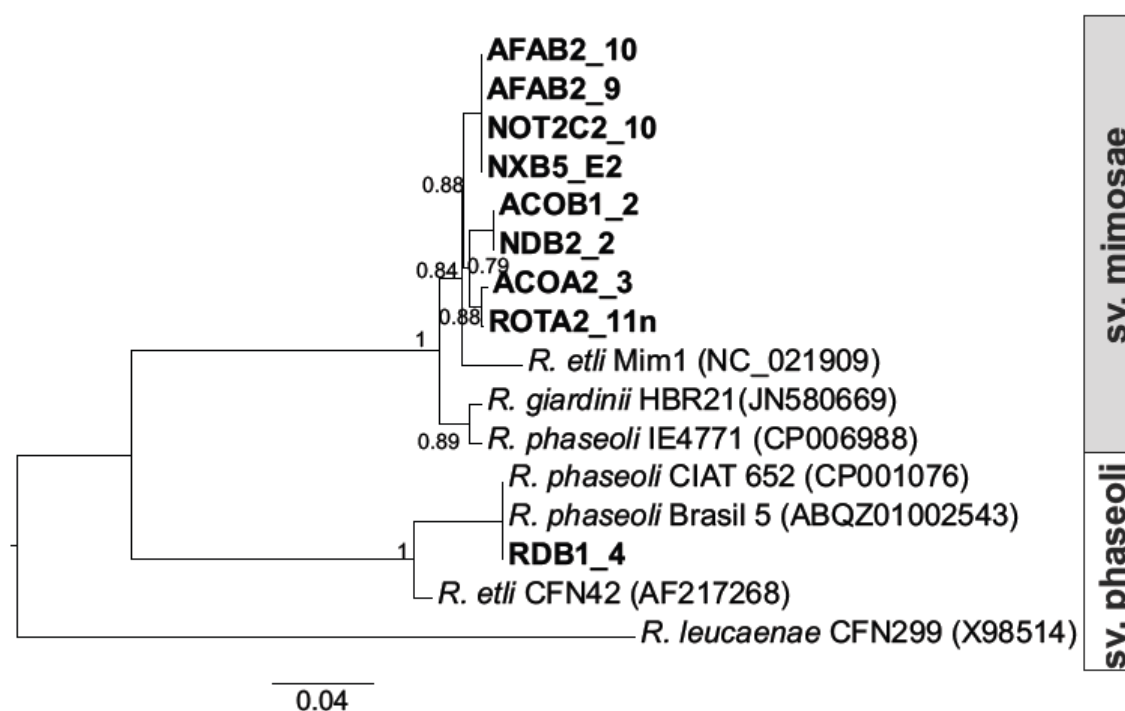
17. *Rhizobium etli* (Ret) of SDTF harbor *phaseoli*- and *mimosae*-type *nodC* alleles

Fig. S11. ML-phylogeny (GTR+I+G) depicting the relationships of the *nodC* sequences from 9 nodule Ret isolates with selected reference sequences from symbiotype mimosae and phaseoli strains retrieved from GenBank. The sequences generated in this study are highlighted in bold-face.

Table S11. Nodule isolates selected for *nodC* amplification and their accession numbers.

Strain	<i>recA</i> clade	Ret <i>recA</i> haplotype	Host	<i>nodC</i> allele type	Accession number
RDB1_4	A	Hap_79	<i>P. vulgaris</i> cv. Rojo colorado	phaseoli	KR558676
ACOA2_3	B	Hap_3	<i>A. cochliacantha</i>	mimosae	KR558668
ROTA2_11n	B	Hap_3	<i>P. vulgaris</i> cv. Rojo colorado	mimosae	KR558669
AFAB2_10	B	Hap_6	<i>A. farnesiana</i>	mimosae	KR558671
NOT2C2_10	B	Hap_6	<i>P. vulgaris</i> cv. Negro Xamapa	mimosae	KR558674
ACOB1_2	B	Hap_7	<i>A. cochliacantha</i>	mimosae	KR558670
NDB2_2	B	Hap_7	<i>P. vulgaris</i> cv. Negro Xamapa	mimosae	KR558673
AFAB2_9	B	Hap_11	<i>A. farnesiana</i>	mimosae	KR558672
NXB5_E2	B	Hap_11	<i>P. vulgaris</i> cv. Negro Xamapa	mimosae	KR558675

References

1. Alberton, O., Kaschuk, G., and Hungria, M. (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem* **38**: 1298-1307.
2. Bala, A., Murphy, P., and Giller, K.E. (2001) Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biol Biochem* **33**: 841-843.
3. Ehinger, M., Mohr, T.J., Starcevic, J.B., Sachs, J.L., Porter, S.S., and Simms, E.L. (2014) Specialization-generalization trade-off in a *Bradyrhizobium* symbiosis with wild legume hosts. *BMC Ecol* **14**: 8.
4. Elliott, G.N., Chou, J.H., Chen, W.M., Bloemberg, G.V., Bontemps, C., Martínez-Romero, E. et al. (2009) *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. *Environ Microbiol* **11**: 762-778.
5. Letunic, I., and Bork, P. (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* **39**: W475-W478.
6. Sachs, J.L., Kembel, S.W., Lau, A.H., and Simms, E.L. (2009) In situ phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4727-4735.
7. Segovia, L., Pinero, D., Palacios, R., and Martínez-Romero, E. (1991) Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 426-433.
8. Turner, S.L., and Young, J.P. (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **17**: 309-319.
9. Vinuesa, P., Rademaker, J.L., de Bruijn, F.J., and Werner, D. (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2096-2104.
10. Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., and Martínez-Romero, E. (2005a) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* **34**: 29-54.
11. Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M.J., Izaguirre-Mayoral, M.L., Bedmar, E.J., and Martínez-Romero, E. (2005b) 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**: 702-716.

6. Resultados adicionales

6.1.1 Elección del punto de corte al 94% para la definición de OTU's para la estima de la diversidad α

Como se muestra en la sección 5.1.1 se eligió un punto de corte del 94% de similitud para la definición de OTU (Operational Taxonomic Unit), para poder hacer las estimas de diversidad α . Para establecer este límite, se seleccionaron 136 secuencias *recA* no redundantes *bona fide* de 10 especies de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Al elegir las secuencias se consideraron aquellas que fueran de diferentes regiones geográficas (para maximizar el muestreo de la diversidad genética de las especies). Se calculó una matriz de distancias bajo el modelo de sustitución K80 con el paquete de R "ape" (version 3.1-4) (Paradis et al., 2004; Borcard et al., 2011; R Development Core Team, 2015), con la función `dist.dna` con los parámetros por defecto. Se calcularon los valores máximos de distancia para cada especie y elegimos el valor correspondiente a la mediana de ellos como punto de corte para delimitar los OTU's (94% similitud) (Schmidt et al., 2015). Este punto funcionó como una medida conservadora para asignar las secuencias a OTU's pero también para validar nuestras asignaciones de especies a las secuencias *recA* en la filogenia de ML (Fig. 2, sección 5.1.1).

Como resultado adicional, se muestra un boxplot de distancias nucleotídicas de 10 especies bonafide de las 136 secuencias de referencia junto con 599 generadas en este trabajo asignadas a las especies *bona fide*, como se observa en la figura (Fig.T2).

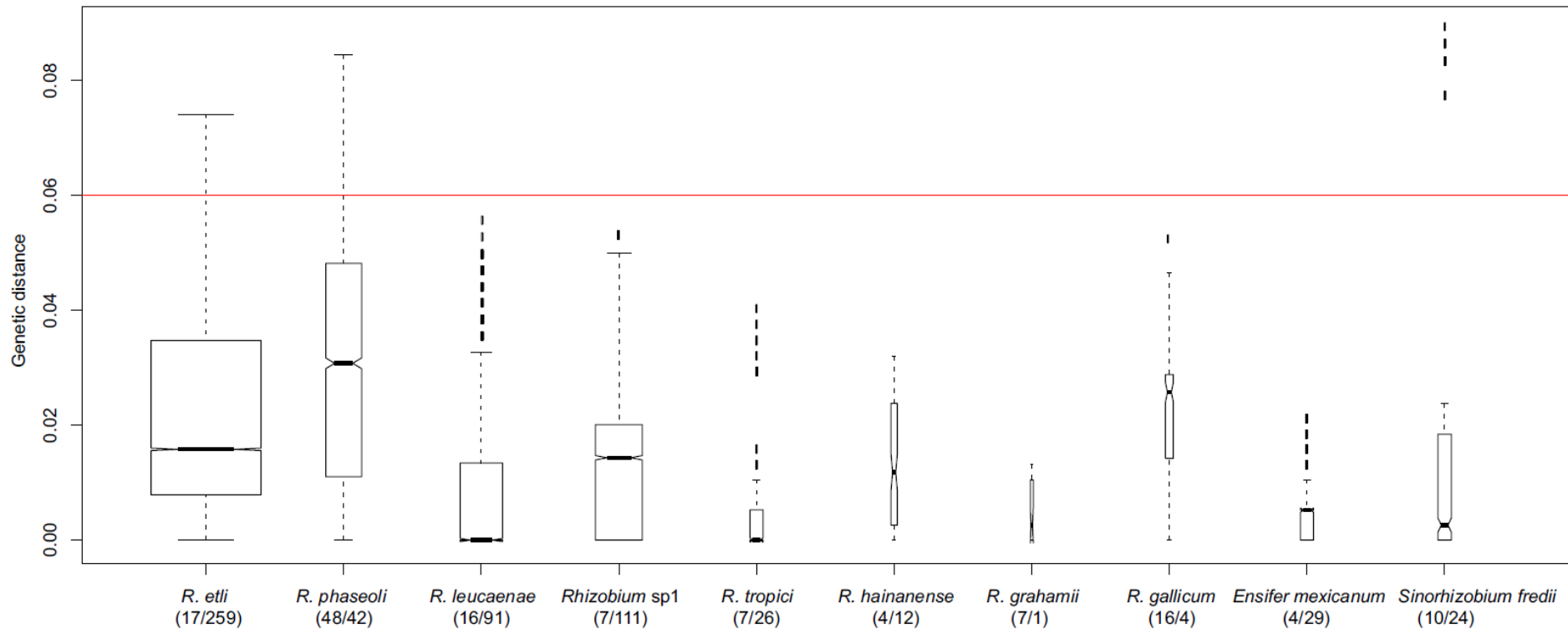


Fig.T2. Boxplots de la distancias genéticas de secuencias *recA bona fide* de 10 especies (136 secuencias de referencia y 599 secuencias de este trabajo). Cada caja muestra el intervalo intercuartil Q1-Q3 (IQR) en el que se distribuyen del 25 al 75% de las distancias genéticas de la especie. La división horizontal de cada caja corresponde a la mediana de los datos. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos ($Q3+1.5IQR$ y $Q1-1.5IQR$). Las líneas que corresponden a las medianas poseen diferentes longitudes ya que despliegan el intervalo de confianza alrededor de la mediana tomando en cuenta el número de datos para cada caja ($\pm 1.57 \times IQR / \sqrt{n}$). La línea horizontal indica el punto de corte elegido como definición de OTU (mediana de los valores máximos). Debajo de la etiqueta de cada especie se muestra en paréntesis el número de secuencias de referencia empleadas y de secuencias utilizadas en este trabajo, separadas por una diagonal.

6.1.2 Validación de la estrategia de aislamiento de rizobios de nódulo por trampeo con frijol usando suelo de bosque de pino y encino como método para la recuperación de la diversidad sin sesgos significativos

Como se menciona en la sección 2 del material suplementario del artículo publicado, la recuperación de cepas de rizobios directamente de plantas puede llegar a ser una tarea difícil en el caso de leguminosas arbustivas y arbóreas. El trampeo de los rizobios bajo condiciones de laboratorio usando plántulas de leguminosas hospederas de interés y suelos a estudiar es una alternativa práctica. Sin embargo, esta estrategia podría sesgar la diversidad de los rizobios recuperada (Bala et al., 2001; Alberton et al., 2006; Ehinger et al., 2014). Como parte complementaria a lo realizado en el artículo, llevamos a cabo el mismo experimento en otro ecosistema, el bosque de pino y encino que se encuentra en la región norte de Morelos (Chamilpa, campo experimental UAEM, julio 2012). En este experimento usamos dos variedades cultivadas de frijol, Negro Xamapa (Nxam) y Rojo colorado (Rcol) y comparamos las frecuencias de las especies de rizobios recuperadas en el laboratorio contra las plantas crecidas directamente en el campo (la descripción del sitio está en la Tabla T2).

El suelo de Chamilpa se tomó y llevó al laboratorio para experimentos de trampeo usando dos métodos de inoculación de plántulas de Nxam y Rcol: a) usando 2ml de una solución de suelo (2 g de suelo diluido en 8mL de solución nutritiva Norris libre de nitrógeno) y b) 2g de suelo aplicados directamente en la radícula. En paralelo, se sembraron diez semillas de Nxam y diez de Rcol en una parcela de 5x5 metros y fueron cosechadas 21 días posteriores a la siembra. Un total de 72 aislados fueron recuperados de todos los métodos de inoculación, incluyendo las cepas obtenidas de los frijoles sembrados en el campo. La lista de los aislados recuperados por linaje taxonómico está en la Tabla T1. Cuatro especies fueron identificadas mediante un análisis filogenético del marcador *recA*. Se hicieron gráficas de mosaico (representación gráfica de la prueba de Chi-cuadrada), las cuales revelaron que no hay una diferencia significativa (p -valor=0.00424) en la diversidad rizobiana recuperada por los diferentes métodos de inoculación, ni entre las plantas crecidas en el campo y en laboratorio (Fig. T3). Se eligió un $\alpha=0.001$ como punto de corte para determinar la significancia de la prueba ya que se encontraron diferencias

mínimas en la recuperación de sólo un linaje minoritario (Rph), mientras que en los demás no fue así. Al evaluar los posibles sesgos del trampeo en otro ecosistema (lo hicimos antes usando suelo de SBC), confirmamos que la estrategia de trampeo es adecuada para la recuperación de los rizobios simbióticos.

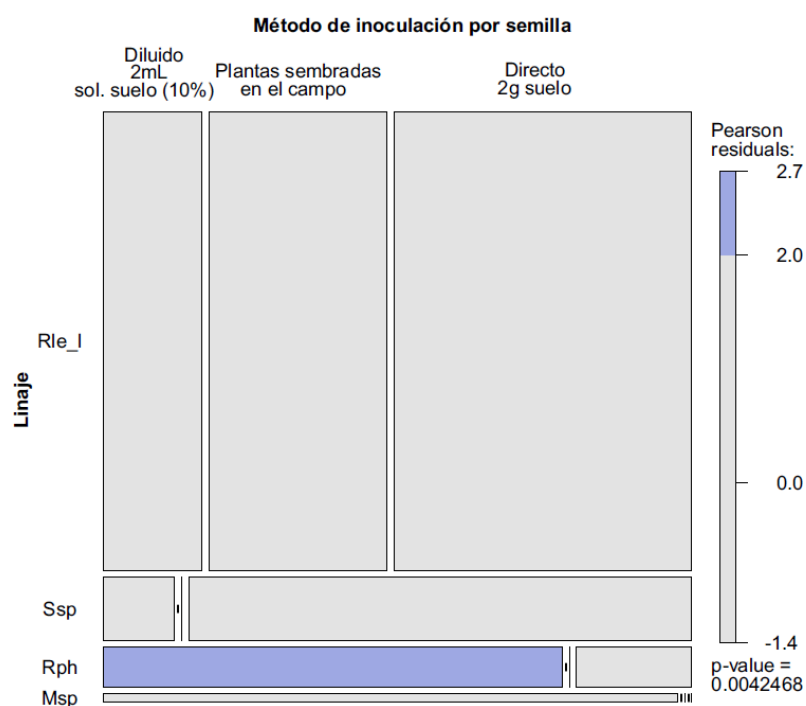


Fig. T3. Gráfica de mosaico de la prueba Chi-cuadrada del método de inoculación de las semillas y los linajes taxonómicos recuperados. La prueba no fue significativa a $\alpha=0.001$ (p -value =0.00424). Los bloques que representan cada residuo de Pearson están coloreados según su magnitud. Rle_I = *R. leguminosarum* like, Ssp= *Sinorhizobium* sp., Rph=*R. phaseoli*, Msp=*Mesorhizobium* sp.

Tabla T1. Recuperación de secuencias *recA* de Chamilpa (bosque de pino y encino, recién deforestado) bajo diferentes métodos de inoculación por semilla.

Lineages	Dilución (2ml suelo dil.)*		Suelo directo (2gr soil)		Sembradas en el campo		Total
	N.Xamapa	R.colorado	N.Xamapa	R.colorado	N.Xamapa	R.colorado	
Rle_I	2	8	6	12	14	16	58
Ssp	1	0	0	0	4	3	8
Rph	1	3	0	0	0	1	5
Msp	1	0	0	0	0	0	1
Total	5	11	6	12	18	20	72

* Dilución de suelo 10% m/v Solución Norris libre de N

6.1.3 Determinación de factores ambientales y de hospedero que afectan la diversidad y la distribución de rizobios simbióticos en Morelos y Guanajuato

Con la finalidad de poder ampliar el panorama ecológico de los rizobios simbióticos del frijol y algunas leguminosas mimosoides, como la distribución y prevalencia en diferentes ecosistemas, estudiamos los nódulos de estas leguminosas en varios puntos del estado de Morelos y Guanajuato. Las preguntas a responder fueron: 1) ¿las poblaciones simbióticas que ocupan los nódulos están diferenciadas de un ecosistema a otro?, 2) ¿Influyen características fisicoquímicas de los sitios como el pH en su distribución y diversidad?, 3) ¿Cuál es la distribución geográfica de los alelos simbióticos de los hospederos a lo largo de los sitios muestreados? y 4) ¿existen diferencias en la recuperación de rizobios dadas por la variedad cultivada de frijol empleada?

Es importante mencionar que lo que se presenta a continuación son resultados preliminares y que aún faltan algunos detalles por concluir, como terminar la secuenciación de algunos aislados y terminar los análisis fisicoquímicos de los suelos de Guanajuato y Chamilpa, Morelos. Sin embargo, ya contamos con patrones y observaciones claras, la cuales se presentaran a continuación.

Se analizaron las comunidades de rizobios simbióticos de nódulo de siete variedades de *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus* (ayocote) y tres leguminosas mimosoides (*Acacia farnesiana*, *A. cochliacantha* y *Prosopis laevigata*). Los sitios muestreados fueron siete en Morelos y uno en Guanajuato. Las características de los sitios muestreados se describen en la Tabla T2.

Los números de aislados obtenidos por suelo y hospedero a los cuales se les ha secuenciado el marcador *recA* se reportan en la Tabla T3. En total se han analizado 625 aislados. En casi todos los experimentos de trampeo se intentó coleccionar al menos 12 nódulos de cada combinación hospedero-suelo. Sin embargo, en algunas combinaciones no fue posible (sus frecuencias aparecen en negritas en la Tabla T3), como la combinación *A. farnesiana*-suelo agrícola A (*agrA*) o como la variedad de frijol bola morado. Esta variedad se inoculó con suelos de varios sitios de Morelos y solo noduló con los suelos agrícolas de Tequesquitengo y Ocuituco. En un inicio también probamos el frijol Chino (*Vigna radiata*) con los suelos de Morelos. Este

6. RESULTADOS ADICIONALES

“frijol” es el cultivo predilecto en Ocuituco (por más de treinta años) y sólo se encontraron tres nódulos con este suelo en todos los experimentos.

Tabla T2. Principales características de los sitios muestreados en este trabajo (2010-2012).

	Sitio							
	consA*	consB	agrB*	agrA*	Teques	Ocuit	Chamil	Guana
Año de muestreo	2012	2010	2012	2012	2010	2010	2012	2015
Ubicación	18°3'27.60"N 98°56'3.78"O	18°31'27.18"N 98°56'5.46"O	18°31'4.76"N 98°56'59.91"O	18°31'3.65"N 98°57'2.59"O	18°36'10.56"N 99°16'56.77"O	18°54'38.17"N 98°44'41.00"O	18°58'55.63"N 99°13'57.22"O	20°39'53.10"N 101°33'28.14"O
pH	4.98	5.90	5.93	5.76	8.1	5.4	6.33	7.3
Ecosistema	SBC, conservado	SBC, conservado	SBC, agrícola poco intensivo 5 años	SBC, agrícola poco intensivo 30 años	SBC, agrícola poco intensivo >30 años	BPE, agrícola poco intensivo >30 años	BPE, deforestado <1año	SBC Agrícola intensivo
Organic Mater (%)	1.88	7.6	3.03	1.21	0.2	3.7	ND	ND
N-NO₃ (mg/Kg)	0	0.4	10.82	4.27	0.02	0.16	ND	ND
P-Bray (mg/Kg)	4.93	6	9.17	4.15	3	33	ND	ND
S-SO₄ (mg/Kg)	15	ND	20.54	14.74	ND	ND	ND	ND
Fe (mg/Kg)	15.60	51	15.08	12.80	4	75	ND	ND
Cu (mg/Kg)	0.22	0.2	0.53	1.52	0	1	ND	ND
Zn (mg/Kg)	0.55	1.7	0.44	0.37	0.1	1.5	ND	ND
Mn (mg/Kg)	15.60	51	32.40	29.50	5	18	ND	ND

*Sitios analizados en (Miranda-Sánchez et al., 2015).

Tepalcingo, Morelos (REBIOSH): conservado A (consA), conservado B (consB), agrícola A (agrA) y agrícola B (agrB).

Tequesquitengo, Morelos (Teques). Chamilpa-Cuernavaca, Morelos (Chamil), Ocuituco Huepalcalco, Morelos (Ocuit).

Tlanalapa Abasolo, Guanajuato (Guana).

Tabla T3. Aislados de nódulos recuperados secuenciados (marcador *recA*) de diferentes sitios del estado de Morelos y Guanajuato.

Leguminosa hospedera	Sitio								Total/ hospedero
	consA*	consB	agrB*	agrA*	Teques	Ocuit	Chamil	Guana	
<i>A. cochliacantha</i> (Acoch)	19	6	22	18	0	1	ND	18	84
<i>A. farnesiana</i> (Afarn)	24	15	24	2	0	3	ND	14	82
<i>P. coccineus</i> (Ayoc)	ND	2	ND	ND	12	10	ND	ND	24
<i>P. vulgaris</i> Bola morado (Bmor)	0	0	ND	ND	9	12	ND	ND	21
<i>P. vulgaris</i> cacahuete (Cacah)	ND	9	ND	ND	9	10	ND	ND	28
<i>P. vulgaris</i> cocona (Coco)	ND	1	ND	ND	8	11	ND	ND	20
<i>P. vulgaris</i> Negro xamapa(Nxam)	25	12	29	23	9	8	29	12	147
<i>Prosopis leavigata</i> (Plaev)	ND	13	ND	ND	2	6	ND	ND	21
<i>P. vulgaris</i> Rojo colorado (Rcol)	33	4	21	28	8	9	43	12	158
<i>P. vulgaris</i> Vaquita negro (Vneg)	ND	ND	ND	ND	6	9	ND	ND	15
<i>P. vulgaris</i> Vaquita rojo (Vroj)	ND	1	ND	ND	9	12	ND	ND	22
<i>Vigna radiata</i> Chino (CH)	ND	0	ND	ND	0	3	ND	ND	3
Total/Sitio	101	63	96	71	72	94	72	56	625

*Sitios analizados en (Miranda-Sánchez et al., 2015).

Tepalcingo, Morelos (REBIOSH): conservado A (consA), conservado B (consB), agrícola A (agrA) y agrícola B (agrB). Tequesquitengo, Morelos (Teques). Chamilpa-Cuernavaca, Morelos (Chamil), Ocuituco Huepalcalco, Morelos (Ocuit). Tlanalapa Abasolo, Guanajuato (Guana).

6.1.3.1 Recuperación de linajes simbióticos de los diferentes sitios muestreados y los diferentes hospederos

Siguiendo los criterios utilizados en el trabajo publicado (Miranda-Sánchez et al., 2015), los 625 aislados analizados fueron agrupados en 21 linajes taxonómicos. Catorce linajes corresponden al género *Rhizobium*, 6 a *Sinorhizobium* y uno a *Mesorhizobium* (Fig. T4A). Las especies más abundantes son *Rhizobium* sp 1 (Rsp1, n=161), *S. americanum* (Sam, n=92), *R. leucaenae* (Rleu, n=82), *R. etli* (Ret,

n=79) y *R. leguminosarum-like* (Rle_I, n=63), en estas abundancias esta comprendido más del 75% de los aislados totales (Fig.T4B). La Fig. T5 muestra los linajes recuperados y sus frecuencias desglosados por hospederos.

6.1.3.2 Distribución de los linajes simbióticos por ecosistemas, pH y hospederos

En la Tabla T4 se muestran las frecuencias absolutas de los linajes recuperados por suelo y hospedero. En conjunto, los suelos de SBC muestreados en el 2012 (consA, agrB, agrA), son los que poseen mayor riqueza en cuanto a rizobios simbióticos, ya que en su inventario posee cada sitio 14, 9 y 8 linajes. Los demás sitios poseen una riqueza que va de dos a cuatro linajes. En todos los sitios se ha observado dominancia de pocos linajes.

Se realizó un análisis de componentes principales para las variables categóricas “ecosistema” y “suelo-pH”, los cuales se muestran en la Fig. T6. Aunque hay varias especies compartidas entre sitios, se observó la agrupación de ellos en función del ecosistema (Fig. T6 A-B) y del suelo-pH (Fig. T6 C-D). En el análisis por ecosistema se observan tres grupos, que corresponden a Selva Baja Caducifolia (SBC) con 14 linajes, Bosque de Pino y Encino (BPE) con 4 y el grupo SBC-Perturbado Alcalino - SBC-agrícola intensivo (SBCPA-SBCAI) el cual comprende tres linajes. El porcentaje de la varianza de la distribución de los linajes en este análisis es de 45.34% y 33.49% para el primer y segundo componente, respectivamente. En el análisis por suelo y pH, se observaron tres grupos de asociación. Dos de ellos se relacionan con pH's similares y el en el tercero están los sitios de SBC conservados (consA y consB). El primer grupo es suelos con pH ácido (5.4-5.93) y el segundo con suelos con pH's que van de moderadamente ácidos a alcalinos (6.3-8.1). Los grupos tienen 6,7 y 8 especies, respectivamente (Fig. T6). Los componentes principales de este análisis explican el 22.85 y el 19.19% de la inercia (varianza) de la distribución de las especies.

6. RESULTADOS ADICIONALES

Tabla T4. Clasificación de las secuencias *recA* en linajes de rizobios de nódulos por hospedero (*Acacia* y *Phaseolus*).

Linaje taxonómico	Suelo								Total de aislados
	consA	consB	agrB	agrA	Teques	Ocuituco	Chamilpa	Guanajuato	
Rsp1	45(8/37)	61(33/28)	33(4/29)	22(3/19)	0	0	0	0	161
Sam	0	0	0	0	68(1/67)	0	0	24(24/0)	92
Rleu	0	0	0	0	0	82(9/76)	0	0	82
Ret	11(6/5)	1(0/1)	41(31/10)	34(9/15)	2(0/2)	0	0	0	79
Rle_l	0	0	0	0	0	5(0/5)	58(0/58)	0	63
Rph	7(4/3)	0	4(1/3)	0	1(1/0)	0	5(0/5)	24(0/24)	41
Em	3(2/1)	0	11(6/5)	5(4/1)	0	0	0	0	19
Rsp2	0	0	1(0/1)	15(2/13)	0	0	0	0	16
Rva_c	11(11/0)	0	0	0	0	0	0	0	11
Atu_c	9(2/7)	0	0	0	1(0/1)	0	0	0	10
Ssp	0	0	0	0	0	0	8(0,8)	0	8
Ssp2	0	0	0	0	0	0	0	8(0,8)	8
Rha_c	1(0/1)	0	2(2/0)	1(1/0)	0	3(0/3)	0	0	7
Rtr	6(6/0)	0	0	0	0	0	0	0	6
Ead_c	2(2/0)	0	2(2/0)	1(1/0)	0	0	0	0	5
Rms_l	1(1/0)	0	1(0/1)	1(0/1)	0	1(1/0)	0	0	4
Rma_l	2(0/2)	0	1(0/1)	0	0	0	0	0	3
Ren_l	1(1/0)	1(1/0)	0	0	0	0	0	0	2
Rsp3	2(0/2)	0	0	0	0	0	0	0	2
Sfr	0	0	0	2(0/2)	0	0	0	0	2
Msp	0	0	0	0	0	0	1(0/1)	0	1
Total aislados	101	63	96	71	72	94	72	56	625
Total de linajes por suelo	13	3	9	8	4	4	3	2	

Los números entre paréntesis separado por una diagonal corresponden al total desglosado por los aislados recuperados por las leguminosas mimosoides (*Acacia* y *Prosopis*) y *Phaseolus*, respectivamente.

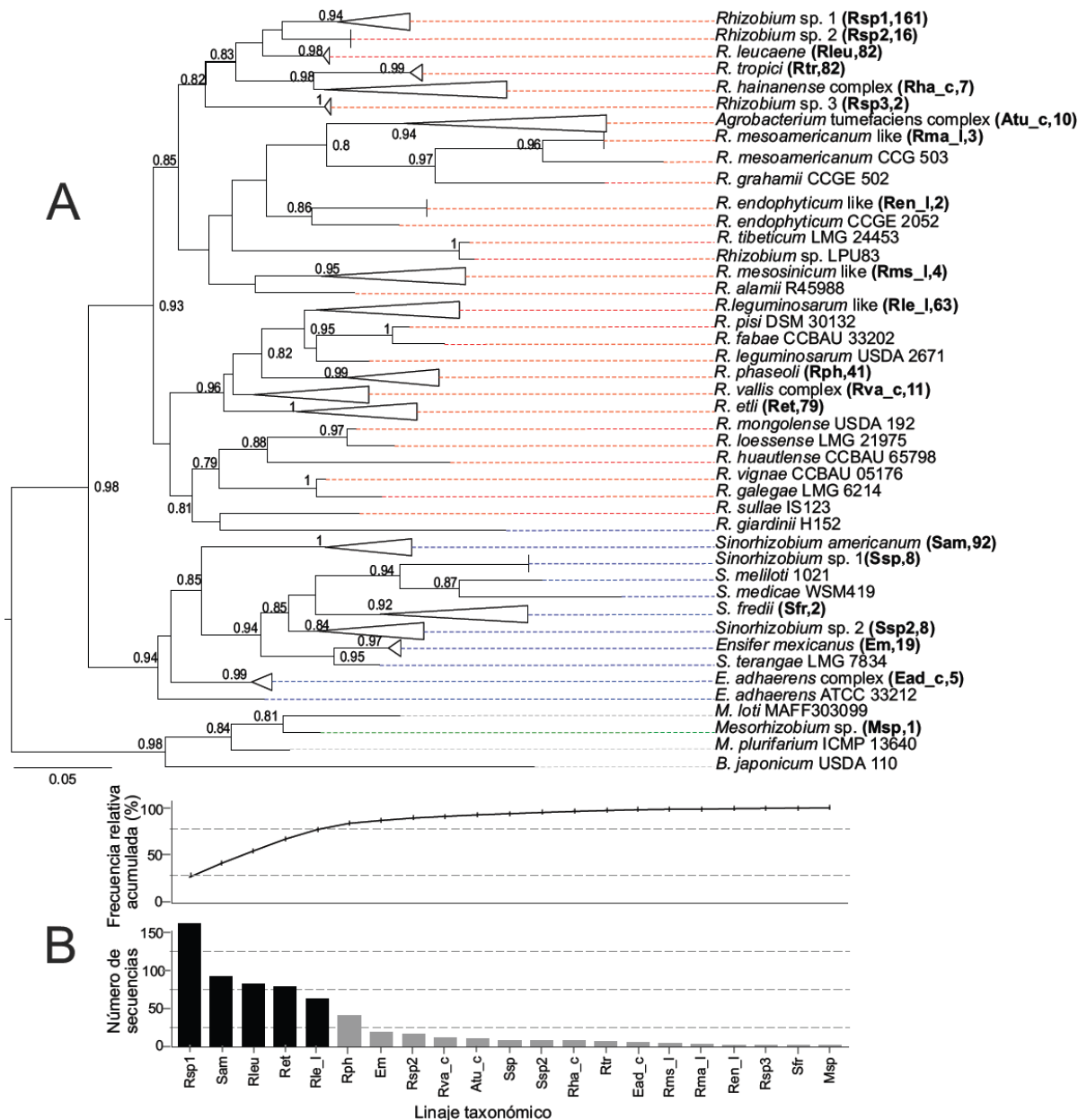


Fig. T4. Análisis filogenético y clasificación de las secuencias *recA* recuperadas de nódulos. Se obtuvieron 21 linajes taxonómicos. El panel A muestra una filogenia de máxima verosimilitud (modelo GTR+I+G) de secuencias *recA* de rizobios (385 sitios) generadas en este proyecto (n=625). Se muestran los valores de soporte de las ramas (tipo -SH) mayores a 0.70. Los clados colapsados están etiquetados con las secuencias de referencia (que se muestran en la tabla S4, sección 5.1.1). La asignación de las secuencias a linajes siguió los mismos criterios que se aplicaron en el artículo publicado. Las claves con las que se manejaron los linajes junto con sus abundancias están entre paréntesis. En el panel B se muestra una curva de rango-abundancia y una curva de frecuencias relativas acumuladas de los linajes simbióticos. En negro se muestran los linajes en los que está contenido el 75% de la abundancia total recuperada.

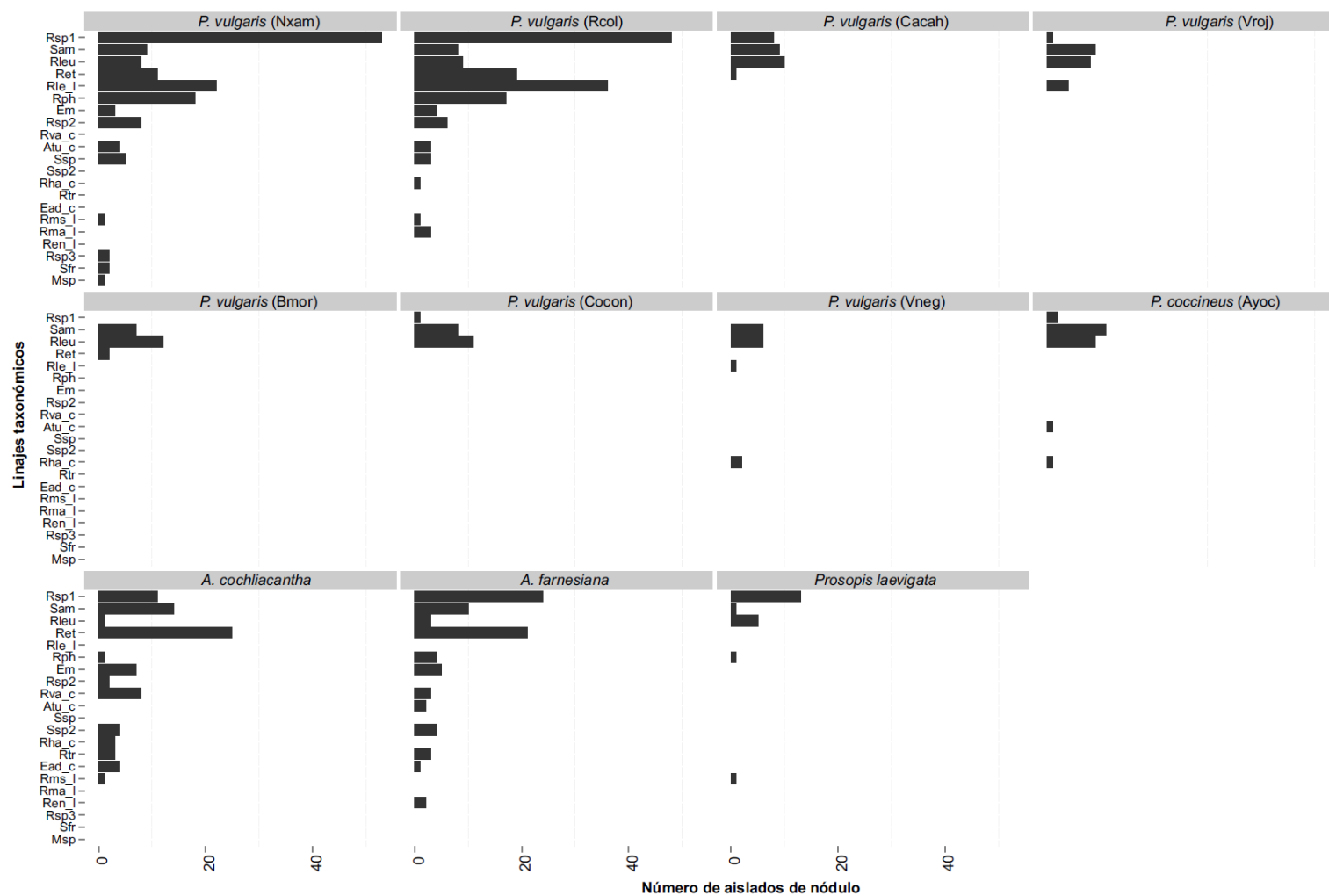


Fig. T5. Linajes de rizobios por hospedero. Se muestra en cada panel una gráfica de barras por cada leguminosa hospedera empleada en este trabajo. Las claves de los linajes se explican en la Fig. T4. No se incluyó el panel correspondiente a *Vigna radiata*, del cual solo se obtuvieron tres aislados de *R.leucaenae* (Rleu).

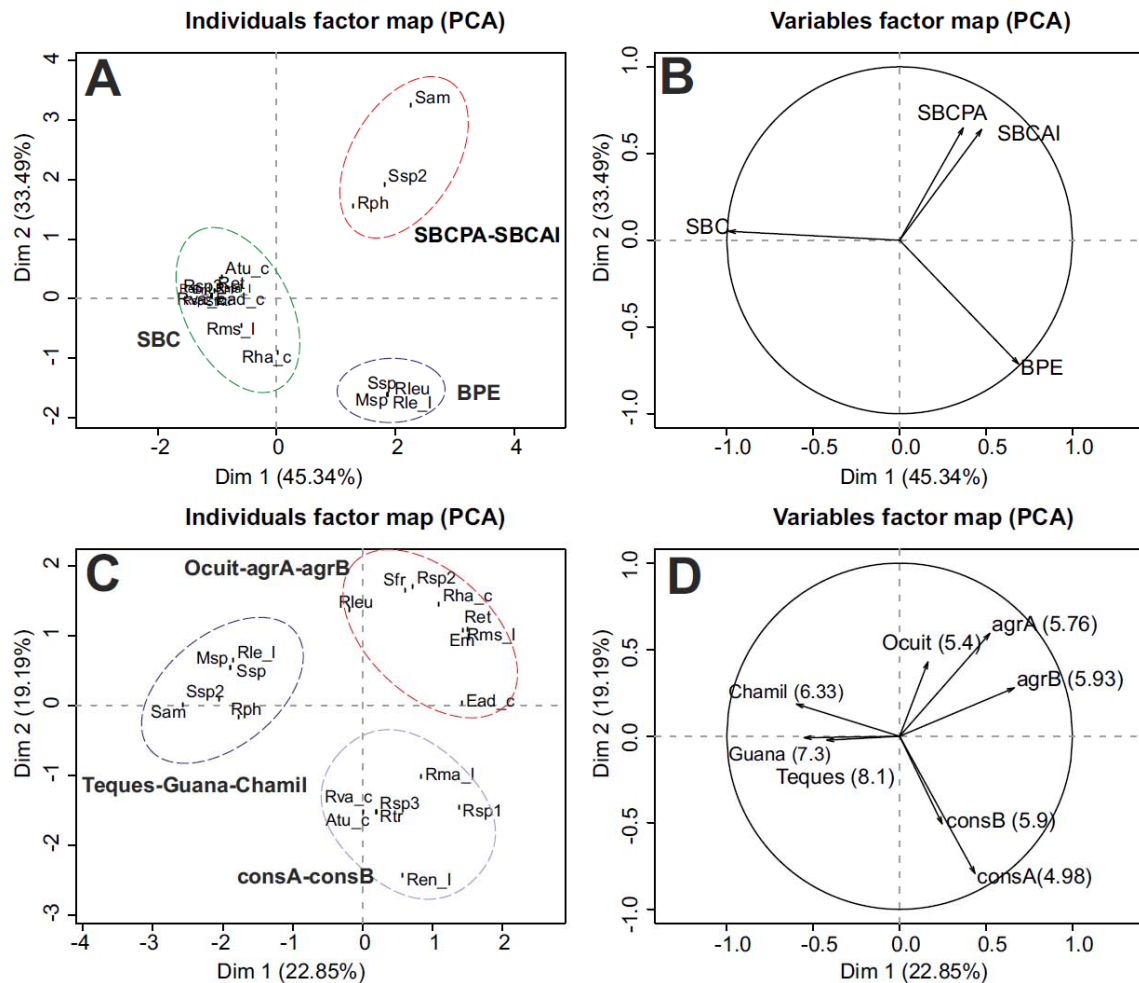


Fig. T6. Análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de linajes simbióticos por ecosistema y por suelo-pH. El análisis de la variable categórica “ecosistema” se muestra en los paneles A y B, y para la variable “suelo-pH” se encuentra en los paneles C y D. Los componentes principales (Dim1 y Dim2) están ordenados en los ejes xy. El porcentaje de la contribución de la inercia (varianza) de los linajes se muestra entre paréntesis. Los linajes están en los paneles A y C, mientras que las variables en B y D. Las etiquetas de los linajes y las variables están en círculos por su asociación. Las claves de los linajes se explican en la Fig. T4.

SBC=Selva Baja Caducifolia, SBCPA=Selva Baja Caducifolia perturbado alcalino, SBCAI=Selva Baja Caducifolia agrícola intensivo y BPE= Bosque de Pino y Encino.

El grupo SBC comprende 14 linajes: Rsp1, Ret, Em, Rsp2, Rva_c, Atu_c, Rha_c, Rtr, Ead_c, Rms_I, Rma_I, Ren_I, Rsp3 y Sfr. El grupo SBCPA-SBCAI, 3 linajes: Sam, Rph y Ssp2 y el grupo BPE, 4 linajes: Rleu, Rle_I, Ssp y Msp.

Se presenta una gráfica integrativa de las abundancias de los seis linajes mayoritarios, con la información de los suelos de procedencia en la Fig. T7. El linaje más abundante, *Rhizobium* sp. 1 sólo se detectó en los sitios de Selva Baja Caducifolia (SBC, sitios consA, agrA y agrB). Por otro lado, *S. americanum* se encontró en suelos con pH > 7, en Tequesquitengo (pH 8.1) fue el linaje dominante, estando presente tanto en leguminosas mimosoides como en las variedades de frijol, mientras que en

Guanajuato, sólo se recuperó en nódulos de acacias. El tercer linaje más abundante fue *R. leucaenae*, que se encontró únicamente en Ocuituco (Bosque de pino y encino, pH 5.4). *R. etli* se aisló principalmente en el ecosistema de SBC y se detectó su presencia (solo dos aislados) en Tequesquitengo. El linaje *R. leguminosarum*-like dominó en Chamilpa (Bosque de pino y encino, pH 6.3).

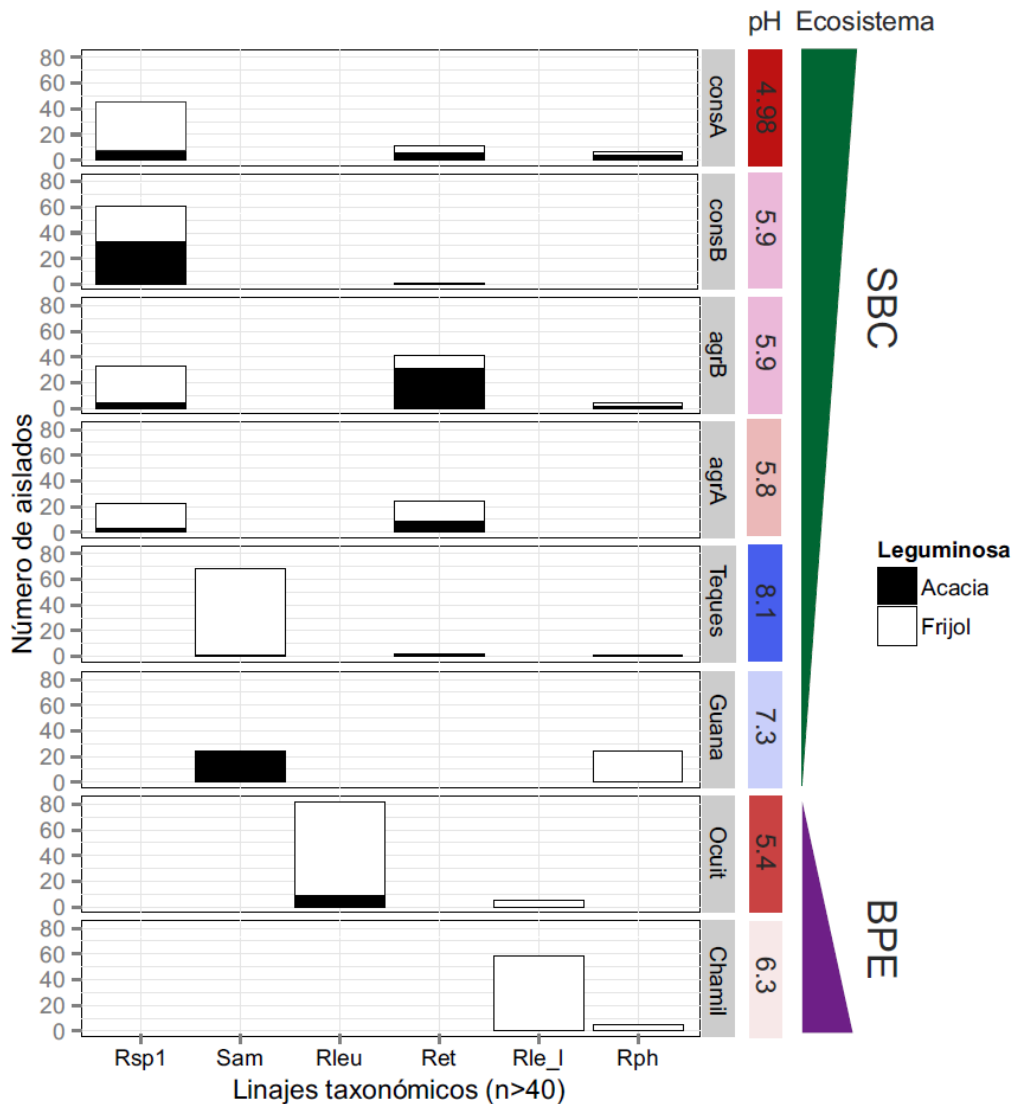


Fig. T7. Distribución de los linajes simbióticos más abundantes ($n > 40$) por sitio, hospedero, pH y ecosistema. Los triángulos a la derecha, representan a manera de gradiente la perturbación existente en los ecosistemas. SBC= Selva Baja Caducifolia, BPE= Bosque de Pino y Encino.

6.1.3.3 Rango de nodulación de las leguminosas hospederas probadas

Los dos tipos de leguminosa empleados en este trabajo recuperaron muchas especies de rizobios, 15 para las mimosoides y 16 para las del género *Phaseolus* (Tabla T5 y Fig. T4-5). Para el caso de *Vigna radiata* (frijol chino), sólo se encontraron tres nódulos con el suelo de Ocuituco, ocupados por *R. leucaenae*. Aunque comparten diez

especies simbióticas (Tabla T5), las abundancias varían según el tipo de hospedero (Fig. T8). Ambos tipos de hospedero mostraron especialización en el reclutamiento de simbios (PDI >0.855). Los rizobios simbióticos mostraron diferentes grados de especialización (Tabla T5). Por ejemplo, *R. etli* fue generalista para ambos tipos de hospederos (PDI=0.283) y *R. leucaenae*, se mostró como especialista para el frijol (PDI=0.877).

En un análisis de componentes principales de los linajes x hospederos x tipo de leguminosa (Fig. T9) se distinguieron tres grupos, con un primer componente principal que explica la abundancia de los linajes del 96.17%. Uno que corresponde a linajes cuya abundancia se ve mejor explicada a que se recuperaron de leguminosas mimosoides, otro a que provienen de frijol y uno intermedio. Este agrupamiento de las especies se correlaciona con los PDIs calculados (Tabla T5).

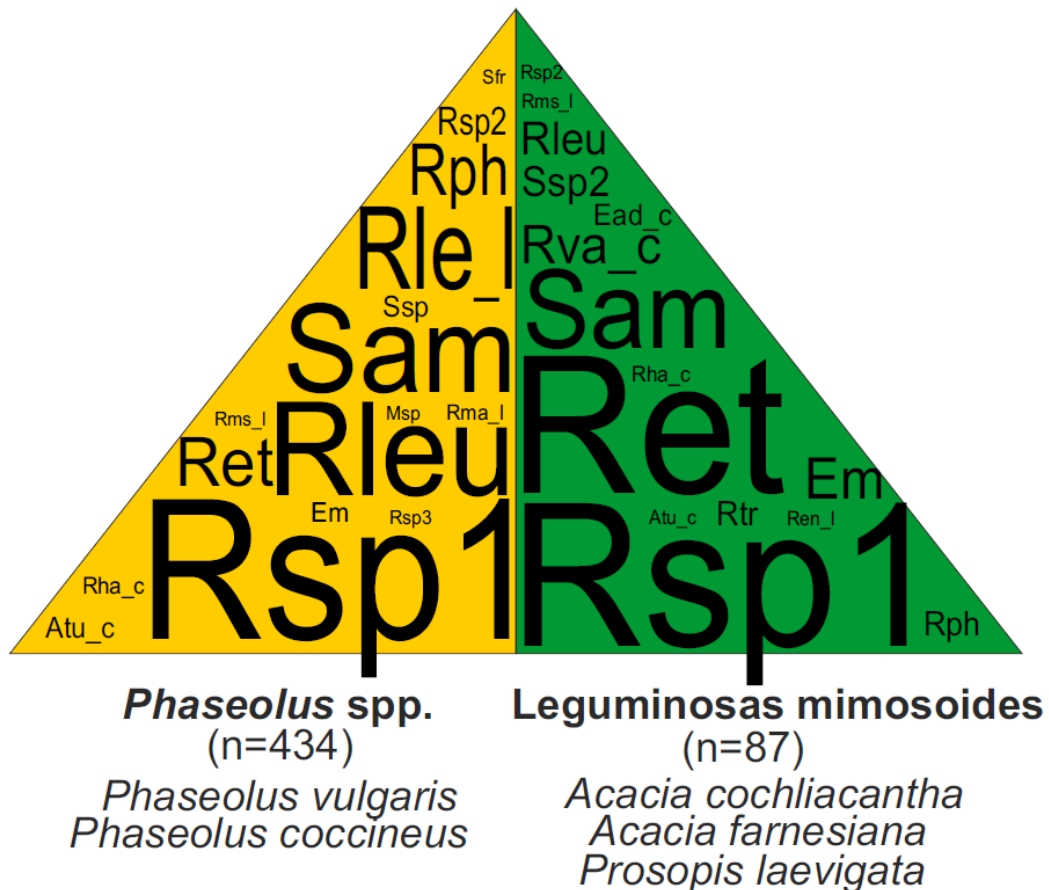


Fig. T8. Linajes simbióticos recuperados según el tipo de hospedero. Del lado izquierdo se muestran los linajes simbióticos del género *Phaseolus* y a la derecha están los de las leguminosas mimosoides. El tamaño de las etiquetas está en función de las abundancias encontradas para cada tipo de hospedero. Las correspondencias de las etiquetas de los linajes aparecen descritas en la Fig. 4 del artículo.

Tabla T5. Linajes recuperados y su índice de diferenciación pareado (PDI) por tipo de hospedero.

Linaje	Número de aislados totales	Leguminosas mimosoides (<i>Acacia</i> spp. y <i>P. laevigata</i>)		<i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>P. coccineus</i>		PDI _{linaje}
			n		n	
Rsp1	161	+	48	+	113	0.575
Sam	92	+	25	+	67	0.627
Rleu	82	+	9	+	73	0.877
Ret	79	+	46	+	33	0.283
Rle_l	63	-	0	+	63	1
Rph	41	+	6	+	35	0.828
Em	19	+	12	+	7	0.417
Rsp2	16	+	2	+	14	0.857
Rva_c	11	+	11	-	0	1
Atu_c	10	+	2	+	8	0.750
Ssp	8	-	0	+	8	1
Ssp2	8	+	8	-	0	1
Rha_c	7	+	3	+	4	0.250
Rtr	6	+	6	-	0	1
Ead_c	5	+	5	-	0	1
Rms_l	4	+	2	+	2	0.500
Rma_l	3	-	0	+	3	1
Ren_l	2	+	2	-	0	1
Rsp3	2	-	0	+	2	1
Sfr	2	-	0	+	2	1
Msp	1	-	0	+	1	1 ^{NA}
Número total de linajes			15		16	
PDI_{leguminosa}			0.855		0.857	

Las estimas de PDI fueron significativas ($p < 0.001$ con un límite de confianza del 99.9%)

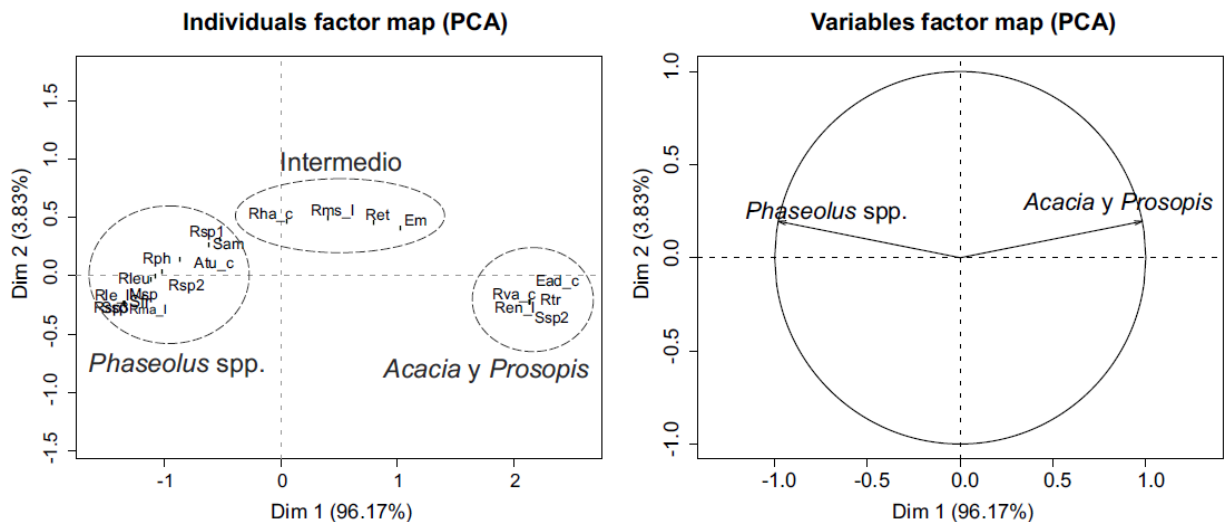


Fig. T9. Análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de linajes simbióticos por tipo de hospedero. Los componentes principales (Dim1 y Dim2) están ordenados en los ejes xy. El porcentaje de la contribución de la inercia (varianza) de los linajes se muestra en paréntesis. Los linajes están a la izquierda, mientras que las variables están a la derecha. Las etiquetas de los linajes y las variables están en círculos por su asociación. Las claves de los linajes se explican en la Fig. T4.

El grupo *Phaseolus* spp. comprende 12 linajes: Rsp1, Sam, Rleu, Rle_l, Rph, Rsp2, Atu_c, Ssp, Rma_l, Rsp2, Sfr y Msp. El grupo Intermedio, 4 linajes: Ret, Em, Rha_c y Rms_l. El grupo *Acacia* y *Prosopis*, 5 linajes: Rva_c, Ssp2, Rtr, Ead_c y Ren_l.

6.1.3.4 Diversidad genética de las especies de rizobios más abundantes

Las especies con más de cuarenta aislados presentaron diferentes niveles de diversidad genética en función del marcador *recA* (Tabla T6). Las especies con más diversidad fueron *R. etli*, *R. leguminosarum*-like y *R. phaseoli*. Las poblaciones totales de las especies más abundantes presentaron una diversidad menor. *Rhizobium* sp. 1, presentó ocho haplotipos, *S. americanum* solo tuvo 5 y *R. leucaenae* fue la especie con menor diversidad ($\pi=0.0003$, 2 haplotipos). La Tabla T7 muestra los índices de diferenciación pareados para los haplotipos más abundantes de *Rhizobium* sp1.

Tabla T6. Diversidad genética del gen *recA* de los principales linajes simbióticos recuperados.

Linaje	n	h	π
<i>Rhizobium</i> sp. 1	161	8	0.01043
<i>S. americanum</i>	92	5	0.01462
<i>R. leucaenae</i>	83	2	0.00030
<i>R. etli</i>	79	20	0.01424
<i>R. leguminosarum</i> like	63	18	0.02663
<i>R. phaseoli</i>	41	8	0.02965

Tabla T7. Distribución por tipo de hospedero de los haplotipos más abundantes de los aislados simbióticos de *Rhizobium* sp1 y los índices pareados de diferenciación (PDI's) para la especialización ecológica.

Haplotipo*	Aislados de nódulo (161)	<i>Acacia</i> spp. y <i>Prosopis laevigata</i> (48) PDI _H =0,696	<i>P. vulgaris</i> y <i>P. coccineus</i> (113) PDI _H =0,881	PDI _{HAP} **
Hap_3	82	16	66	0.756
Hap_4	49	17	32	0.469
Hap_1	26	14	12	0.143

El número total de aislados por hospedero está indicado entre paréntesis.

*Haplotipos simbióticos totales = 8. **Todos los PDIs fueron significativos ($p < 0.001$ con un límite de confianza del 99.9%). PDI_H=PDI por hospedero. PDI_{HAP}= PDI por haplotipo.

6.1.3.5 Evaluación de la diversidad de rizobios simbióticos recuperada por las variedades cultivadas de frijol negro Xamapa y rojo colorado en diferentes ecosistemas

Se evaluó la recuperación de rizobios simbióticos de las dos variedades de frijol comunes en todos los sitios de muestreo: negro xamapa (Nxam) y rojo colorado (Rcol), trece de 16 linajes fueron comunes y tres minoritarios fueron exclusivos de la variedad

Nxam. Al realizar una prueba de chi-cuadrada (Fig. T10) se observó que no hay diferencia significativa en sus simbioses ($p\text{-value}=0.40903$).

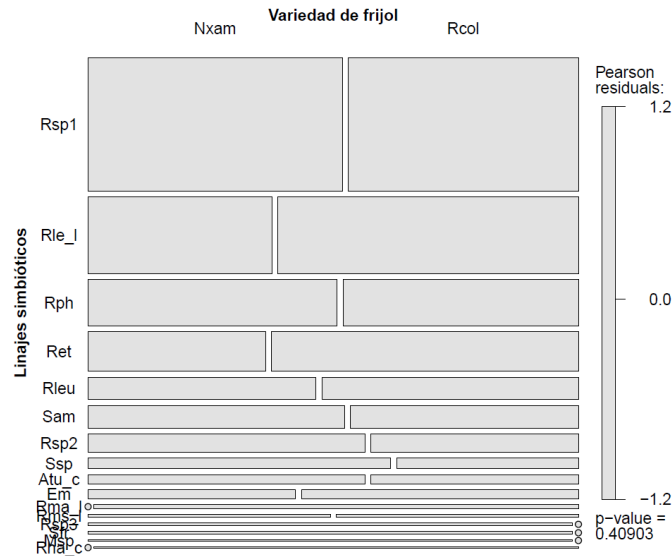


Fig. T10. Gráfica de mosaico de la prueba Chi-cuadrada los linajes de rizobios de los nódulos de las variedades cultivadas de frijol Negro Xamapa (Nxam) y Rojo Colorado (Rcol) en todos los sitios muestreados de este trabajo. La prueba no fue significativa ($p=0.40903$). Los bloques que representan cada residuo de Pearson están coloreados según su magnitud.

6.1.3.6 Simbiovariedades en los sitios muestreados: análisis de los genes simbióticos *nifH*, *nodC* y *nodA*

Se seleccionaron al azar algunos aislados de los linajes más abundantes y se secuenciaron fragmentos de los genes *nifH*, *nodC* y *nodA* (Fig. T11, T12 y T13, respectivamente). Las filogenias de máxima verosimilitud revelaron la presencia de cuatro simbiovares: tropici, mediterraneanse, mimosae y phaseoli. Las tres primeras se encontraron asociadas tanto a frijol como a leguminosas mimosoides, mientras que la simbiovar phaseoli sólo se encontró en aislados de frijol.

Se calculó la diversidad general (número de haplotipos, diversidad nucleotídica por sitio) de cada simbiovar y se muestra en la Tabla T8. Alelos simbióticos relacionados a los del tipo simbiovar tropici se recuperaron de *R. leucaenae*, *Rhizobium* sp. 1, *Rhizobium* sp. 2, *R. hainanense* complex y *R. tropici*. Las filogenias de *nifH* y *nodC*, mostraron que dentro de este grupo hay una subdivisión que separa a los aislados del linaje *Rhizobium* sp1 de *R. leucaenae* y otras especies cercanas. La simbiovar tropici presentó diversidades nucleotídicas por sitio (π) de 0.021 a 0.034 en los aislados secuenciados. Las especies de *S. americanum* y *Sinorhizobium* sp. 2 presentaron

los identificadores GI. El clado correspondiente a los alelos tipo simbiovar tropici se divide en los grupos I y II.

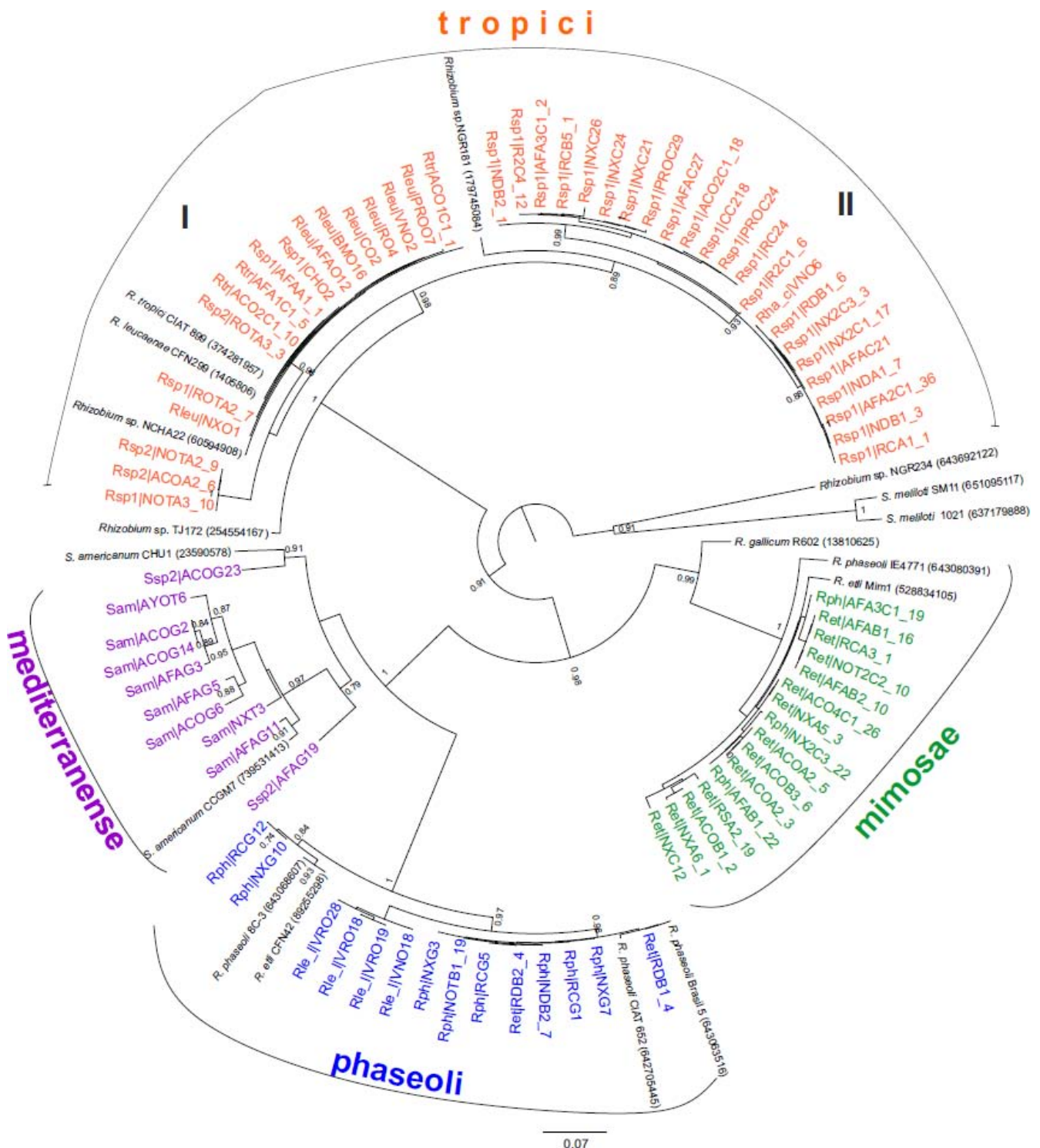


Fig. T12. Filogenia de máxima verosimilitud del gen simbiótico *nodC* (modelo GTR+I+G) de los aislados de nódulo de este trabajo. Las simbiovariedades detectadas fueron: mimosae, phaseoli, tropici y mediterranense, las cuales están señaladas en el clado correspondiente. Los soportes de rama son tipo –SH. La estima se realizó con un alineamiento de 357 nucleótidos sin gaps. Los números entre paréntesis en las secuencias de referencia son los identificadores GI. El clado correspondiente a los alelos tipo simbiovar tropici se divide en los grupos I y II.

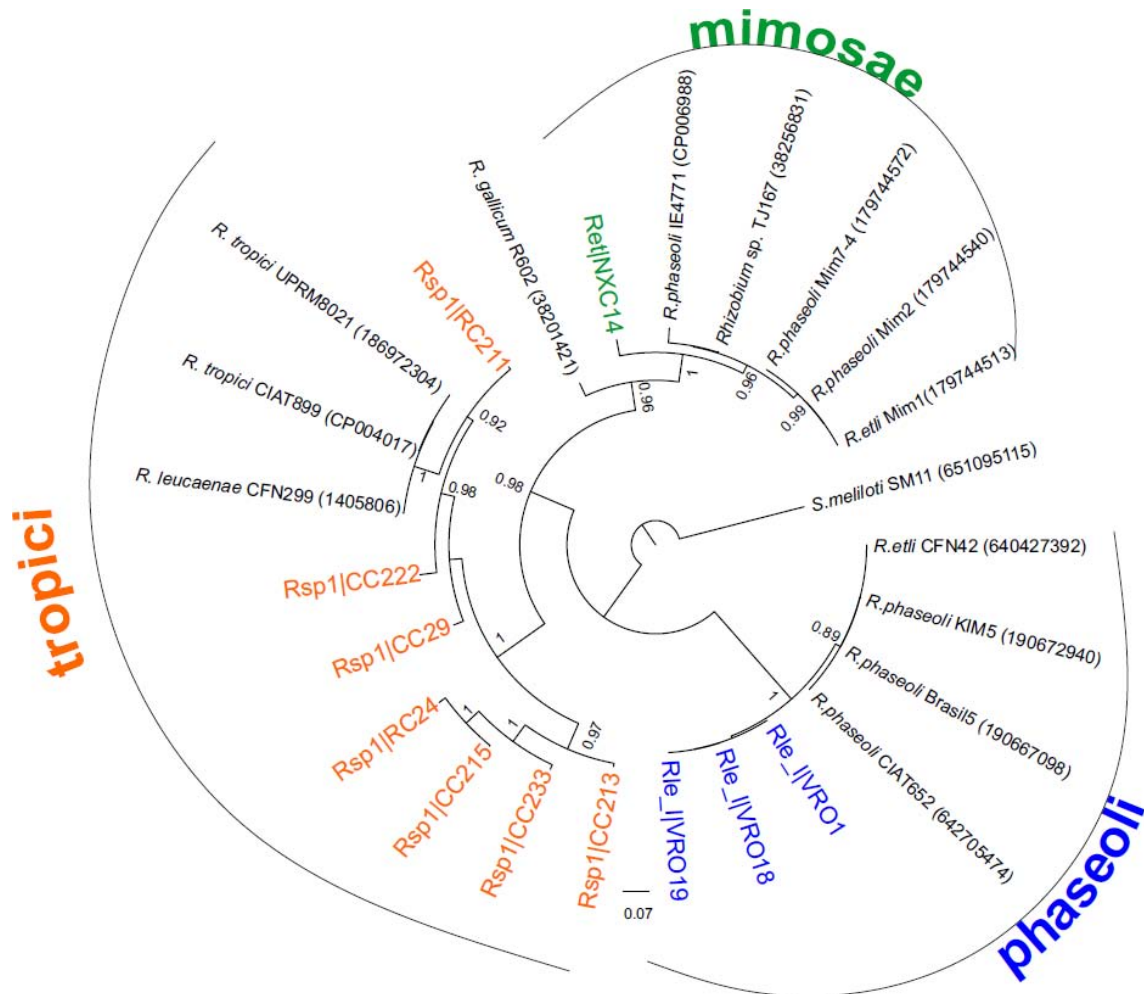


Fig. T13. Filogenia de máxima verosimilitud del gen simbiótico *nodA* (modelo GTR+I+G) de aislados seleccionados de nódulo de este trabajo. Las simbiovariedades detectadas fueron: mimosae, phaseoli y tropici, las cuales están señaladas en el clado correspondiente. Los soportes de rama son tipo –SH. La estima se realizó con un alineamiento de 433 nucleótidos sin gaps. Los números entre paréntesis en las secuencias de referencia son los identificadores GI.

Tabla T8. Diversidad genética de los genes simbióticos las simbiovariedades detectadas.

Simbiovariedad	<i>nifH</i>	<i>nodC</i>	<i>nodA</i>
tropici	0,02175 (n=22)	0,02627 (n=40)	0,03417 (n=7)
mimosae	0,00273 (n=2)	0,03417 (n=10)	-- (n=1)
phaseoli	0,00712 (n=8)	0,00781 (n=8)	0,000 (n=3)
mediterraneense	0,04005 (n=16)	0,03417(n=10)	--

6.1.3.7 Distribución de los linajes y las simbiovariedades encontradas en sitios de diferentes ecosistemas de Morelos y Guanajuato.

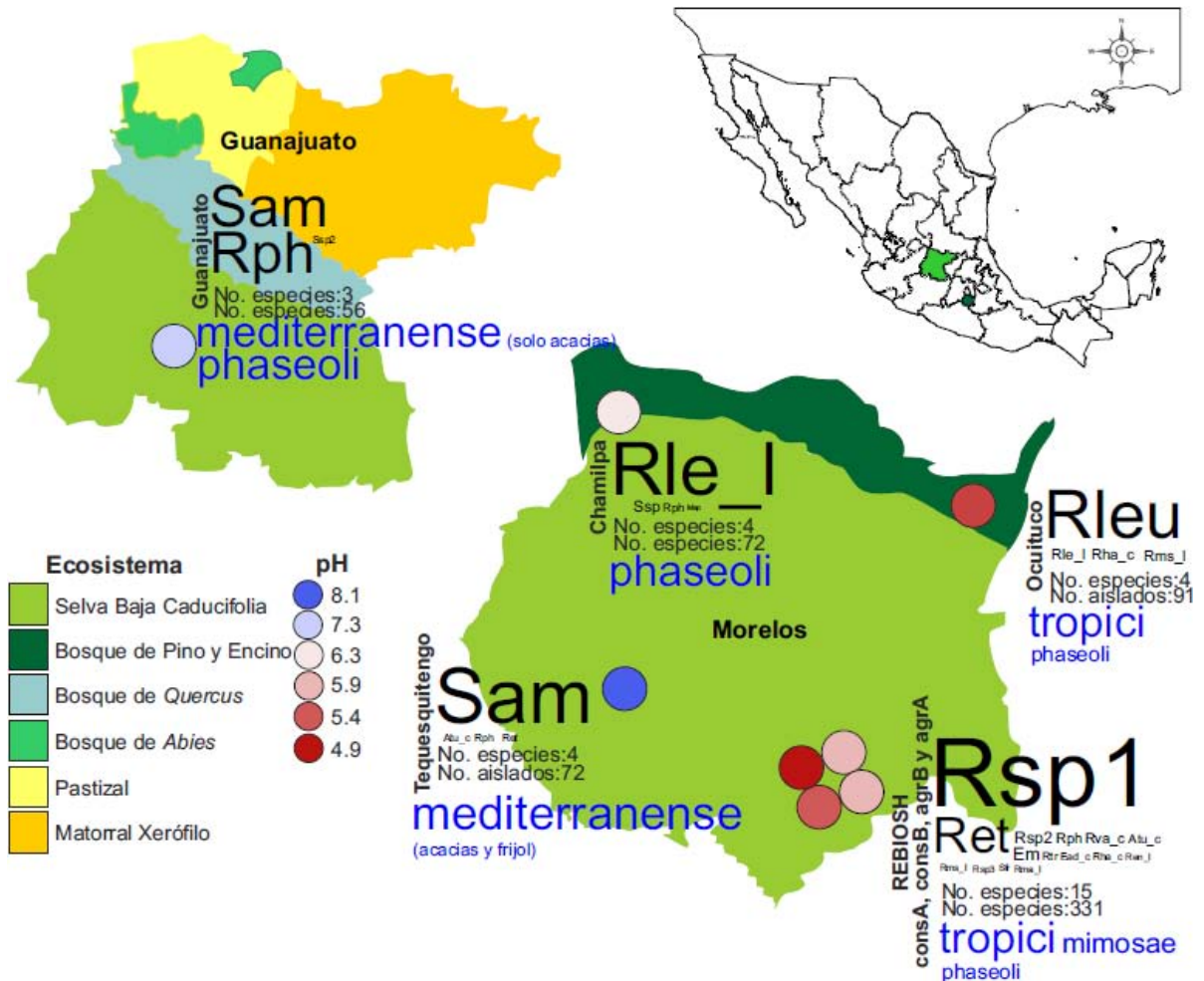


Fig. T14. Distribución de los linajes simbióticos y simbiovariedades recuperados en diferentes ecosistemas de Morelos y Guanajuato. El mapa muestra la ubicación de los estados, los cuales están coloreados según la distribución potencial de sus ecosistemas. Los puntos de muestreo aparecen con círculos de color en función de su pH. Las claves de color están del lado derecho. Cada sitio contiene información de los linajes aislados (letras negras) y de las simbiovariedades detectadas (letras azules). El tamaño de los linajes y simbiovariedades están en función del número de aislados recuperados.

Como resumen de los hallazgos encontrados en esta parte del proyecto de doctorado se muestra un mapa de la distribución de los linajes y simbiovares en los estados muestreados (Fig. T14). La mayoría de los rizobios encontrados pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Se observa la riqueza encontrada en el ecosistema SBC y las especies dominantes en cada sitio muestreado. De la misma forma las simbiovares detectadas presentan una distribución diferencial, donde la simbiovar *mimosae* es exclusiva de SBC. La simbiovar *tropici* se encuentra tanto en SBC como en BPE (Ocuituco), aunque parece haber diferenciación en los alelos simbióticos de

los genes *nifH* y *nodC*, las cuales separan a las poblaciones en función del suelo (Fig. T11 y T12). En el caso de la simbiovariedad phaseoli se detectó en SBC, en BPE y en Guanajuato (SBC-agrícola intensivo), donde fue más abundante. Por último, la simbiovariedad mediterránea solo se detectó en suelos con pH > 7. Esta se detectó también en Tequesquitengo (pH 8.1) tanto en frijol como en leguminosas mimosoides, mientras que en Guanajuato (pH 7.3) sólo se aisló en nódulos de *Acacia* spp.

7. Discusión general

Este proyecto de doctorado surgió de la necesidad de entender los patrones de diversidad de los rizobios y abrir un poco el panorama ecológico de este grupo microbiano considerando sus diferentes estilos de vida. Para lograr eso, se hizo un análisis comparativo de los patrones de alfa- y beta-diversidad de las comunidades de rizobios de suelo, rizoplano y nódulo en suelos de SBC (un conservado y dos agrícolas de baja intensidad) del estado de Morelos. Aquí mostramos la fuerte selección de la planta (acacias y frijoles) sobre las comunidades de rizobios. Por otro lado, se estudiaron los factores que afectan la diversidad de los rizobios simbióticos y la distribución de las simbiovariedades asociadas a diferentes variedades cultivadas de frijol y a algunas leguminosas mimosoides, esto se exploró en suelos provenientes de diferentes ecosistemas con características contrastantes, como el pH y el uso de suelo de los sitios muestreados. Los cuales fueron en la selva baja caducifolia (SBC) y el bosque de pino y encino (BPE) en el estado de Morelos. Como punto externo se muestreó un sitio agrícola intensivo de SBC del estado de Guanajuato.

7.1 Patrones de diversidad de las comunidades de la familia Rhizobiaceae que habitan suelo, rizoplano y nódulos revelan una fuerte selección de los rizobios por las leguminosas

En la primera parte de esta tesis, los rizobios fueron aislados para identificar las posibles asociaciones entre los linajes cromosomales con los diferentes hospederos y así, comparar la diversidad encontrada con el total de la comunidad de la familia *Rhizobiaceae* que está en el suelo. Ello fue posible mediante la elección del marcador *recA* común en todos los hábitats. El uso de aproximaciones dependientes

e independientes de cultivo complementaron el estudio de la diversidad de dichas comunidades.

La diversidad de rizobios asociada a las leguminosas de SBC ha sido explorada superficialmente en México. Se ha reportado la existencia de cinco especies, incluyendo dos originarias de ese ecosistema (Wang et al., 1998; Wang et al., 2002; Toledo et al., 2003; Wang et al., 2003; Lloret et al., 2007). La simbiovar mimosae de *R. etli* también se describió a partir de nódulos de *Mimosa affinis* de SBC del estado de Morelos (Wang et al., 1999; Bontemps et al., 2015). Como se mencionó en la introducción, este ecosistema es megadiverso y las leguminosas mimosoides dominan en él, por lo que se podría esperar que la diversidad de rizobios en esos suelos sea más amplia que lo que hasta ahora se ha descrito. Nuestra estima de la diversidad molecular de la familia *Rhizobiaceae* se basó en 977 secuencias *recA* (de librerías de amplicones de DNA metagenómico de suelo así como de aislados rizoplano y nódulo). Se encontraron 25 linajes de esta familia tomando un enfoque conservador para la clasificación de las mismas (ver artículo).

Los linajes dominantes recuperados de nódulo y rizoplano pertenecieron al género *Rhizobium*, en base a las filogenias del *recA*. Este marcador se encuentra bien representado en las bases de datos y refleja consistentemente la filogenia de especies de los rizobios (Vinuesa et al., 2005b; Vinuesa et al., 2008; Vinuesa, 2010). Este inventario de rizobios, producto de la conjunción de diferentes aproximaciones, es de los más grandes reportados para una sola región hasta ahora. Si bien, antes se habían hecho librerías de amplicones de genes simbióticos como *nodC* y *nodD* (Zézé et al., 2001; Sarita et al., 2005), ésto sólo proporcionaba información del potencial simbiótico de las comunidades, pero no de la riqueza y abundancia de las especies de rizobios que no necesariamente son simbióticos, además, se sabe que los genes simbióticos puede moverse entre las comunidades por transferencia horizontal (Sullivan y Ronson, 1998; Moulin et al., 2004; Althabegoiti et al., 2014). En los tres sitios muestreados observamos en promedio 27 OTU's mientras que el estimador no paramétrico Chao1 de especies esperadas fue de 32 en promedio, lo cual muestra que nuestra estima de la diversidad estuvo basada en un esfuerzo de muestreo razonablemente profundo. En nuestro trabajo, el uso de una estrategia independiente de cultivo que fue linaje-dirigida nos permitió un buen muestreo la

familia *Rhizobiaceae* a pesar de secuenciar pocos cientos de clonas, lo cual es consistente con los resultados en otros grupos microbianos (Contreras-Moreira et al., 2009; Sachman-Ruiz et al., 2011).

Los sitios muestreados presentaron diversidades alfa similares, pero al hacer una clusterización mediante análisis UNIFRAC (diversidad beta), los sitios agrícolas fueron más similares entre ellos que con el sitio conservado, debido a que fueron diferentes en su composición. Nuestros resultados fueron consistentes con otros trabajos, donde al utilizar el marcador 16S rRNA se mostró que sitios agrícolas presentaron riquezas similares a sitios de bosque tropical pero sus diferencias estaban en la composición y abundancias de pocos linajes (Jesus et al., 2009; Montecchia et al., 2015).

7.1.1 Las leguminosas filtran la diversidad de las comunidades de rizobios del suelo en el rizoplano y nódulo

Mediante análisis de diversidad alfa se observó una mayor riqueza de OTU's en la comunidad del suelo que en los hábitats rizoplano (~1.7 veces mayor) y nódulo (~3 veces mayor) en los dos géneros de leguminosa estudiados. Lo que sugiere una fuerte selección de las leguminosas sobre los rizobios. Al realizar análisis de componentes principales (PCA), también se confirmó lo anterior, ya que la inercia (varianza) de los linajes se vió mejor explicada por el hábitat (primeros dos componentes), mientras que el uso de suelo (conservado vs agrícola) quedaron explicados por el tercero y cuarto componentes del mismo análisis.

Se ha observado en trabajos de comunidades de rizobios que es mayor la riqueza en el rizoplano que la encontrada en nódulos de *Lotus corniculatus* en Nueva Zelanda (Sullivan et al., 1996) y también en especies silvestres de *Lotus* en la costa norte de California (Sachs et al., 2009). De la misma forma, en estudios previos se había calculado que la proporción de aislados de rizobios simbióticos y no simbióticos de *R. leguminosarum* bv. phaseoli era de aproximadamente el 2.5% (Segovia et al., 1991). En nuestro trabajo, la proporción de aislados de rizoplano de *R. etli* a los que se les detectó por PCR el gen simbiótico *nodC* fue del 20%, mostrando la misma tendencia que el reporte previo. Las diferencias entre ambas estimas se puede deber al número de secuencias analizadas en cada trabajo y a la

clasificación taxonómica de los aislados que llevamos a cabo. La proporción de rizobios no-simbióticos puede ser mayor en el suelo, particularmente en zonas donde las leguminosas son escasas (Sullivan et al., 1996; VanInsberghe et al., 2015).

7.1.2 Los linajes rizobianos de las comunidades del suelo, rizoplano y nódulo presentaron una distribución de cola larga tipo “biosfera rara”

Curvas de rango-abundancia de los linajes recuperados en cada hábitat revelaron que hay pocos linajes dominantes, seguidos de una distribución de cola larga correspondiente a linajes minoritarios. Dicho patrón coincide con el denominado “biosfera rara”. Éste, se describió originalmente en comunidades exploradas con el gen 16S rRNA en diversos hábitats (Sogin et al., 2006; Elshahed et al., 2008; Lynch y Neufeld, 2015).

En nuestro trabajo, se tomaron medidas para que las secuencias de la librerías no presentaran sesgos y artefactos inherentes a la reacción en cadena de polimerasa (PCR) como quimeras y heterodúplexes (Polz y Cavanaugh, 1998; Acinas et al., 2005). Asignamos las secuencias a linajes taxonómicos siguiendo un punto de corte de similitud conservador (94%), lo cual descarta que la distribución de cola larga que observamos pueda atribuirse a artefactos y sesgos derivados de la secuenciación (Huse et al., 2010; Kunin et al., 2010).

Los organismos raros poseen un gran potencial ecológico, especialmente en ambientes heterogéneos y cambiantes (Aanderud et al., 2015; Lynch y Neufeld, 2015). Interesantemente, un miembro de dicha biosfera rara, el linaje *Rhizobium* sp. 1 (Rsp1) es el principal simbiote especialista del frijol en suelos de SBC de Morelos. Lo mismo sucede con el *Agrobacterium tumefaciens* complex que domina en rizoplano pero está poco representado en las comunidades del suelo. Esta distribución de cola larga también se ha mostrado en aislados de rizosfera y de nódulos en otros sistemas (McInnes et al., 2004; Sachs et al., 2009).

7.1.3 La estructura de las comunidades de rizobios del suelo, rizoplano y nódulo soportan el “modelo multipasos” de adquisición de la microbiota de las raíces

Nuestros hallazgos de la estructura de las comunidades de rizobios del suelo, rizoplasma y nódulo son consistentes con lo encontrado en otras plantas no leguminosas (como maíz, arroz y *Arabidopsis* spp.) para las que se ha postulado que la adquisición de la microbiota de su raíz está dada en múltiples pasos a lo largo de los diferentes microbiomas del suelo, rizosfera, rizoplasma y endosfera (Peiffer et al., 2013; Schlaeppi et al., 2014; Edwards et al., 2015). En las leguminosas, la colonización de los tejidos del nódulo y la diferenciación de bacteroides de los rizobios involucran señales moleculares especializadas entre los compañeros simbióticos (Madsen et al., 2010; Oldroyd, 2013; Gourion et al., 2015). Esto agrega un nivel más de ajuste fino en la selección de la microbiota asociada a las raíces de leguminosas.

7.1.4 El hospedero también selecciona a nivel intra-específico: Haplotipos generalistas y especialistas

Se demostró que la selección del hospedero sobre la familia *Rhizobiaceae* opera tanto en la colonización del rizoplasma como en el nódulo, y que además, esta selección actúa a nivel de especies y al interior de las mismas. El género de los hospederos y sus hábitats de la raíz (rizoplasma y nódulo) fueron los principales componentes (primero y segundo, respectivamente) que explicaban la abundancia de los linajes obtenidos (sección 7.1.2).

Con excepción de *R. etli*, los linajes asociados al rizoplasma y nódulo mostraron un aumento significativo en su abundancia respecto a la encontrada en el suelo. Sin embargo, las poblaciones de *R. etli* se enriquecieron fuertemente en haplotipos específicos en cada hábitat. Lo anterior sugiere que factores específicos del hospedero y del rizobio influyen en la proliferación localizada de especies y genotipos poco abundantes. Los factores conocidos por contribuir a la dominancia de los rizobios en los hospederos van desde la dominancia numérica en suelo (Louvrier et al., 1996) hasta la alta competitividad por la ocupación de los nódulos (Triplett y Sadowsky, 1992). Además se ha sugerido que existe selección hospedero-específica de genotipos rizobianos en etapas tempranas de la infección (Simms y Taylor, 2002; Zanetti et al., 2010; Regus et al., 2014) y sanciones que impone la leguminosa a simbioses poco eficientes en la fijación de nitrógeno, las cuales son

posteriores a la formación de los nódulos (Kiers y Denison, 2008; Marco et al., 2009; Sachs et al., 2010b; Akcay y Simms, 2011) y pueden afectar las abundancias de los rizobios en el suelo (Thrall et al., 2011).

Aunque la especie de *R. etli* ha sido reconocida ampliamente como el principal simbionte del frijol en América (Segovia et al., 1993; Silva et al., 1999; Silva et al., 2003; Aguilar et al., 2004), nosotros la encontramos como dominante en las dos especies de *Acacia* que usamos, pero no en los nódulos de *Phaseolus vulgaris*. Esta aparente contradicción puede explicarse en parte por los recientes cambios taxonómicos de la especie, donde la mayoría de las cepas previamente clasificadas como *R. etli* pasaron a formar parte de *R. phaseoli* (López-Guerrero et al., 2012). En las filogenias de máxima verosimilitud que realizamos (ver artículo Fig.2A y 5), claramente se separan ambas especies en distintos clados, lo que hace que nuestra clasificación de secuencias en ambos linajes sea confiable. La población de *R. etli bona fide* aquí estudiada es la más grande reportada hasta ahora.

El linaje que dominó la ocupación de los nódulos de frijol en los tres sitios de SBC estudiados fue *Rhizobium* sp. 1, pese a que se encontró en baja frecuencia en suelo y rizoplaneo. Este es filogenéticamente cercano a *R. leucaenae* (Ribeiro et al., 2012). El linaje contempla también al aislado de *Rhizobium* sp. NGR181, que se aisló a partir de *Mimosa diplotricha* en Papua Nueva Guinea (Elliott et al., 2009).

Las poblaciones de *R. etli* y *Rhizobium* sp.1 presentaron haplotipos *recA* generalistas y especialistas para la nodulación, que coexisten en las rizosferas de las leguminosas hospederas. Encontramos una mayor estructura en la población de *R. etli*, la cual comprendió dos grandes clados. El primero con haplotipos especialistas (clado A, Fig 5 del artículo) y el segundo con haplotipos generalistas (clado B) en nodular frijol. Esta estructura se puede correlacionar funcionalmente con la dominancia de la simbiovar mimosae, dada por los alelos simbióticos *nodC*, en el clado B y de la simbiovar phaseoli en el clado A. La simbiovar mimosae es conocida por tener un mayor rango de hospederos que la simbiovar phaseoli (Wang et al., 1999; Rogel et al., 2011; Rogel et al., 2014).

Se necesitan trabajos experimentales para determinar los efectos de la dicotomía observada en los alelos simbióticos y el fondo cromosomal, sobre la adecuación simbiótica de las leguminosas y de los rizobios. Esto comparando el desempeño simbiótico de genotipos especialistas y generalistas en frijol y acacias (Thrall et al., 2011; Bever et al., 2013).

Por otro lado, se requieren estudios que involucren técnicas independientes de cultivo para la estima del potencial simbiótico existente en los suelos estudiados, ya que como muestran nuestros resultados, particularmente en las población de *R. etli* (Fig. 5 del artículo publicado) hay muchos genotipos que sólo fueron evidenciados en las librerías de amplicones. Además dichos trabajos deben de estar acompañados de una correlación con el inventario florístico de esos suelos. Nosotros hicimos algunas pruebas con oligos para los genes simbióticos *nodC* y *nifH*, pero por las características de la secuencia del gen *nodC*, no tuvimos éxito en la amplificación a partir de DNA metagenómico y en el caso de *nifH*, las pocas clonas secuenciadas correspondieron a genes del género *Bradyrhizobium* (datos no mostrados), un género muy importante que no es contemplado en este trabajo, pero que ha sido estudiado también en éste (Zozaya, 2010) y otros ecosistemas (Sachs et al., 2009; López-López et al., 2013; VanInsberghe et al., 2015). Para evidenciar el potencial simbiótico de la familia *Rhizobiaceae* se tiene que mejorar la aproximación linaje-específica e incluso considerar otras metodologías como la PCR cuantitativa con sondas específicas.

7.2 Factores ambientales y de hospedero afectan la diversidad y la distribución de rizobios simbióticos en Morelos y Guanajuato

Como segunda parte de este trabajo se incorporaron resultados preliminares de la búsqueda de rizobios simbióticos en ecosistemas, pH's y uso de suelo contrastantes. Además de los ya obtenidos en el trabajo publicado (Miranda-Sánchez et al., 2015), se agregaron los datos de rizobios simbióticos de otro sitio conservado (consB) de la REBIOSH y de un sitio con pH alcalino en Tequesquitengo, que está en la zona de distribución potencial de SBC en Morelos. Se incluyeron puntos de muestreo de bosque de pino y encino en el norte del estado, uno con un pH de 5.4 (Ocuituco, Huepalcalco) y otro en el campo experimental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM-Chamilpa,

pH=6.33). Y como punto externo se muestreó en el estado de Guanajuato, el cuál a diferencia de los demás explorados, es un sitio agrícola intensivo de frijol y está localizado en la zona de distribución potencial de SBC en ese estado.

En Guanajuato se aisló a la cepa tipo de *R. etli*, los alelos simbióticos de ésta corresponden a la simbiovariedad phaseoli (Segovia et al., 1993). La decisión de muestrear un sitio en este estado fue motivada por el hecho de que en nuestros resultados -en los suelos de SBC de Morelos-, encontramos muchos aislados de *R. etli* pero muy pocos correspondían a la simbiovariedad phaseoli. Por lo que queríamos incluir un sitio agrícola intensivo para frijol en esta zona del país. Con la finalidad de comparar la diversidad de las poblaciones de *R. etli* de Morelos así como la distribución de sus simbiovares con las que encontráramos en Guanajuato.

Como resultado, hasta ahora contamos con 625 aislados secuenciados en el marcador *recA*, los cuales provienen de siete variedades cultivadas de frijol y tres leguminosas mimosoides (*A. cochliacantha*, *A. farnesiana* y *Prosopis laevigata*).

Al ampliar la exploración de los rizobios que ocupan el hábitat de nódulo en otros ecosistemas se recuperaron 6 linajes adicionales a los 15 encontrados en tres sitios de SBC en Morelos, dando un inventario total de 21 linajes. Lo cual indica que en los diferentes sitios explorados la SBC posee una gran diversidad de rizobios simbióticos, lo cual puede ser debido a la gran dominancia y riqueza de leguminosas en este ecosistema (Dorado et al., 2005a).

7.2.1 El tipo de vegetación y el pH del suelo son determinantes clave en la distribución de los rizobios de nódulo

Los linajes más abundantes fueron *Rhizobium* sp. 1 (n=161), *S. americanum* (n=92), *R. leucaenae* (n=82), *R. etli* (n=79), *R. leguminosarum*-like (n=63) y *R. phaseoli* (n=41). La distribución de los rizobios simbióticos siguió patrones asociados principalmente al tipo de hospedero (primer componente en el PCA que explica el 96% de su abundancia, Fig T7), lo cual confirma que el hospedero impone una fuerte selección sobre la comunidad total de rizobios para elegir a sus simbiosites. Sin embargo, los hospederos eligen sobre lo que está en el suelo y aunque no contamos con una estima de las comunidades totales de rizobios en los distintos sitios estudiados, observamos que hay fuertes constricciones en la diversidad de los

rizobios simbióticos dados por factores ambientales, como el tipo de vegetación de los ecosistemas, ya que en un PCA estas variables explican el 79% de su varianza (Fig. T6A-B), mientras que el pH explica el 42% (Fig. T4C-D).

7.2.2 Las leguminosas hospederas probadas tienen un amplio rango de nodulación con especies de rizobios generalistas y especialistas

Tanto las leguminosas mimosoides como *Phaseolus* spp. se han reportado como hospederos promiscuos, debido a que pueden establecer simbiosis con muchas especies de rizobios (Zhang et al., 1991; Herrera-Cervera et al., 1999). De hecho, en este trabajo encontramos que las leguminosas mimosoides nodulan con 15 especies, mientras que el frijol lo hace con 16. Otras leguminosas tienen rangos de hospederos más estrechos, por ejemplo, *Medicago truncatula* y *M. sativa*, que pueden ser noduladas por cepas de pocas especies como *Sinorhizobium medicae* o *S. meliloti*, respectivamente (Bailly et al., 2011; Liu et al., 2014). Por el lado de los rizobios, la cepa NGR234 de *S. fredii* es capaz de nodular con 112 géneros de leguminosas, lo cual demuestra el gran rango de hospederos que también puede tener este grupo microbiano (Pueppke y Broughton, 1999).

Las leguminosas estudiadas pese a su amplio rango de hospedero, presentaron alta especialización en su elección de simbiosis (PDI's > 0.855) (Tabla T5 y Fig T12), lo cual ya habíamos observado en el trabajo previo (Miranda-Sánchez et al., 2015). Las poblaciones simbióticas de este trabajo también presentaron diferentes grados de especialización, por ejemplo, *R. etli* fue generalista (PDI=0.283) y *R. leucaenae* especialista (PDI=0.877).

Sin embargo, la caracterización de los simbiosis como especialistas o generalistas, también está limitada por la comunidad de rizobios existentes en los suelos estudiados, ya que para el caso de *Rhizobium* sp. 1, el PDI de las poblaciones de SBC cambió al agregar los datos del sitio conservado B. Este linaje pasó de altamente especialista para frijol (PDI=0.824) a moderadamente especialista (PDI=0.575). Lo cual se debió a un incremento en los haplotipos Hap_1 y Hap_4 en el sitio conservado B (Tabla T7).

7.2.3 No hay diferencias significativas en la recuperación de rizobios simbióticos en las variedades de frijol cultivadas en los diferentes ecosistemas analizados

El uso de las leguminosas como plantas trampa ha permitido el estudio de muchas muestras de suelo, así como la obtención de nódulos en condiciones controladas en invernadero (Herrera-Cervera et al., 1999; Verástegui-Valdés et al., 2014). Como parte del trabajo publicado, y la sección 6.1.2 de esta tesis, evaluamos los posibles sesgos en la obtención de rizobios debidos a los métodos de inoculación empleados, estos experimentos se llevaron a cabo tanto en SBC, como en el campo experimental de la UAEM (BPE) y no detectamos diferencias significativas en los linajes recuperados entre los diferentes métodos de inoculación probados.

Muy pocos estudios han explorado la diversidad de rizobios simbióticos en diferentes especies o variedades cultivadas de las leguminosas de estudio (Souza et al., 1994; Aserse et al., 2012; López-López et al., 2013). El uso de solo una variedad de frijol para la estima de diversidad de rizobios simbióticos podría limitar lo observado debido a que las interacciones entre la leguminosa y los rizobios son específicas (Thrall et al., 2011; Terpolilli et al., 2012). México es uno de los centros de origen y domesticación de frijol (Gepts, 1988; Papa y Gepts, 2003; Aguilar et al., 2004) , por lo que hay gran cantidad de variedades cultivadas, por lo que esperaríamos observar diferencias en la recuperación de rizobios simbióticos. Por ejemplo, cada variedad de frijol posee un perfil particular de compuestos fenólicos (Espinosa-Alonso et al., 2006; de Lima et al., 2014) que pueden interactuar con las comunidades de rizobios del suelo provocando la expresión de genes que conllevan a la síntesis del factor Nod, comenzado la elicitación del nódulo mediante un proceso altamente complejo y regulado, por lo que esta primera interacción se considera como el primer paso de selección de compañero simbiótico (Ripodas et al., 2013).

En este trabajo observamos que la variedad de enredadera bola morado, solo fue capaz de nodular en los sitios agrícolas de Ocuituco (BPE, pH=5.4) y Tequesquitengo (SBC-perturbada, pH=8.1), mientras que en los suelos de SBC de la REBIOSH no se encontraron nódulos. Se escapa de nuestro conocimiento la razón de esta preferencia, ya que no contamos con información filogenética o de perfiles de exudados de las variedades cultivadas de frijol estudiadas, pero este resultado

confirma la complejidad de las interacciones rizobio-leguminosa y que aún hay mucho por explorar en cuanto a la elección de hospedero en esta simbiosis.

Uno de nuestros intereses en este trabajo era conocer si había alguna diferencia en la recuperación general de rizobios simbióticos atribuida a la cultivar empleada como planta trampa. Todas las variedades de frijol empleadas son originarias del estado de Morelos. Aún no contamos con las secuencias de los aislados de todas las combinaciones variedad-cultivada x suelo, pero para responder a nuestra pregunta, elegimos a las variedades Negro Xamapa (mata) y Rojo colorado (enredadera) porque fueron utilizadas como plantas trampa en todos los sitios muestreados. En la prueba estadística Chi-cuadrada, no se encontraron diferencias significativas entre estas dos variedades. Esto podría deberse a que se ha sugerido que las variedades domesticadas de frijol son genéticamente similares en función de su sitio de domesticación y presentan poca estructura entre ellas (Papa y Gepts, 2003).

7.2.4 Se encontraron cuatro clados de alelos simbióticos en diferentes ecosistemas de Morelos y Guanajuato.

Como se mencionó en la sección 7.1.5, por mucho tiempo se ha considerado a *R. etli* como la especie simbiote principal del frijol en México y América (Segovia et al., 1993; Souza et al., 1994), pero con el paso del tiempo se han descrito a otras especies como *R. gallicum* (Silva et al., 2003), *S. americanum* y *R. leguminosarum* (Verástegui-Valdés et al., 2014), *R. mesoamericanum* (López-López et al., 2012) y *R. leucaenae* (Ribeiro et al., 2012). Pero sólo pocas zonas agro-ecológicas del país han sido exploradas y son pocos los trabajos que analizan a los rizobios desde un punto de vista de comunidades y poblaciones (Souza et al., 1994; Silva et al., 1999; Silva et al., 2003; Ormeno-Orrillo et al., 2012a).

En años recientes, muchos de los aislados clasificados como *R. etli* pasaron a formar parte la especie *R. phaseoli* (López-Guerrero et al., 2012), quedando como aislados mexicanos de *R. etli* la cepa tipo CFN42 (Segovia et al., 1993), algunos aislados de frijol (Souza et al., 1994), de rizosfera (Segovia et al., 1991), y otros obtenidos de nódulos de *Mimosa* spp. (Wang et al., 1999; Bontemps et al., 2015). Aquí mostramos que al utilizar dos variedades de frijol inoculadas con suelo de Guanajuato (de donde proviene la cepa CFN42), estas nodularon con cepas de *R. phaseoli*, mientras que poblaciones *bona fide* de *R. etli* solo se encontraron en sitios

de SBC. Lo anterior sitúa a la especie como simbiote del frijol importante de la SBC de Morelos y no como simbiote prevalente del frijol en otras regiones de México. Lo cual también se ha observado en otras regiones exploradas del país, donde *R. etli* no es el principal simbiote recuperado de frijol (Verástegui-Valdés et al., 2014).

En cuanto las simbiovariedades de *R. etli* y *R. phaseoli*, en Guanajuato los aislados de *R. phaseoli* presentaron alelos simbióticos tipo phaseoli y los pocos aislados recuperados de Morelos fueron tanto de la simbiovar phaseoli como mimosae, mientras que la mayoría de los aislados de *R. etli* tuvieron genes *nodC* tipo mimosae (87.5%, n=16) y pocos aislados phaseoli (12.5%).

El linaje *R. leguminosarum*-like se detectó en los sitios de bosque de pino y encino, dominó en Chamilpa (pH=6.33) y se encontraron pocos aislados en Ocuituco (pH=5.4). En suelos ácidos de Chiapas e Hidalgo (pH 4.25 y 4.92) también se encontraron aislados pertenecientes a este linaje (Verástegui-Valdés et al., 2014) con genes *nodC* de la simbiovar phaseoli. Contamos con algunas secuencias simbióticas de los aislados de Chamilpa y estas, junto con las de los aislados de Ocuituco, correspondieron a la simbiovar phaseoli.

En México solo se han reportado unos pocos aislados de *R. leucaenae* (Ribeiro et al., 2012). Esta especie se ha caracterizado por ser muy tolerante a condiciones ambientales estresantes debido a su alta estabilidad genética (Hungria et al., 2000; Hungria et al., 2003). En nuestro trabajo, fue el linaje simbiótico dominante en Ocuituco. Los aislados de esta especie presentaron la menor diversidad nucleotídica por sitio entre los linajes más abundantes aquí estudiados, lo cual puede estar dado por la presión selectiva del pH o bien porque en ese suelo por más de treinta años se ha sembrado *Vigna radiata*, lo cual podría causar una disminución en la diversidad rizobiana por selección del hospedero. Los pocos aislados encontrados en esta leguminosa (frijol chino) también pertenecieron a *R. leucaenae*.

S. americanum originalmente fue aislado de *Acaciella agustissima*, una leguminosa mimosoide en Morelos (Rincón-Rosales et al., 2009). Se han detectado otros aislados en suelos alcalinos de Xochimilco y Coahuila como simbiotes de frijol (Verástegui-Valdés et al., 2014). Incluso se ha detectado en semillas de frijol (Mora et al., 2014). En otras partes del mundo, *S. americanum* se ha reportado como

simbionte de *Leucaena leucocephala* en China (Xu et al., 2014) y de frijol en Túnez (Mnasri et al., 2012). Todos los aislados encontrados de esta especie tienen alelos simbióticos cercanos a la simbiovar mediterránea, aunque aún hacen falta estudios a nivel plasmídico, así como pruebas de nodulación para la asignación de su simbiovar. Nuestros aislados de este linaje también provienen de suelos alcalinos y poseen alelos simbióticos cercanos a la simbiovar mediterránea. Solo que en el caso de Guanajuato solo se recuperaron aislados que eran simbioses de acacias.

Sin duda aún falta mucho por estudiar de la Ecología de los rizobios, tras más treinta años de estudio, aún no conocemos todas sus funciones en el suelo. De la misma forma, en las leguminosas, desconocemos mucho de los procesos que rigen la selección de sus simbioses. Este trabajo es una invitación a hacer más estudios de diversidad de los rizobios en México, donde se utilicen aproximaciones complementarias para su estudio y también, para que en futuro se estudie más de la adecuación fisiológica de los simbioses, con la finalidad de tratar de entender más de la ecología de estos microorganismos.

8. Conclusiones

- Mediante la estima de la diversidad de rizobios de la familia *Rhizobiaceae* usando una combinación de estrategias dependientes e independientes de cultivo, se recuperaron un total de 25 linajes de los diferentes microhábitats de la raíz en la selva baja caducifolia de Morelos. Este es uno de los inventarios más grandes de la familia para una sola región.
- En los hábitats estudiados (suelo, rizoplano y nódulo) se observó una distribución de las especies tipo “biosfera rara”.
- Se observó estructura y composición diferencial de la comunidad de *Rhizobiaceae* en suelo, rizoplano y nódulo de las leguminosas muestreadas, lo cual soporta el modelo multipasos de adquisición de la microbiota de las raíces.
- La leguminosa hospedera en rizoplano y nódulo filtra fuertemente la diversidad de las comunidades rizobianas del suelo. Además, el hospedero también selecciona a nivel intra-específico.

- Se detectaron haplotipos generalistas y especialistas para las especies simbióticas más importantes.
- Se encontraron patrones de distribución y diversidad asociados al hospedero, al tipo de ecosistema y pH en suelos de Morelos y Guanajuato.
- La Selva Baja caducifolia es el ecosistema con más diversidad de rizobios simbióticos. En el Bosque de Pino y Encino se recuperaron mayoritariamente a *R. leucaenae* y *R. leguminosarum*-like con diferencias en la recuperación atribuidas al pH del suelo. En suelos alcalinos se encontró principalmente a *S. americanum*.
- Se encontraron poblaciones *bona fide* de *R. etli* únicamente en suelos de SBC, mientras que en Guanajuato predominó *R. phaseoli*.
- Se detectaron cuatro clados de alelos simbióticos en los sitios muestreados: mimosae en SBC, tropici en SBC y BPE, mediterraneanse en suelos alcalinos, mientras que phaseoli en Guanajuato y en BPE.

9. Perspectivas

- a) Evaluar el efecto sobre la adecuación simbiótica de genotipos seleccionados de rizobios especialistas y generalistas de *R. etli* y *Rhizobium* sp.1.
- b) Estudiar la ecología molecular y genética de poblaciones comparativa de *Rhizobium etli* recuperados de nódulos y rizoplaneo, mediante la secuenciación de los genomas de aislados seleccionados.
- c) Explorar el potencial simbiótico de los suelos estudiados bajo una aproximación independiente de cultivo.
- d) Formalizar el estado taxonómico del linaje *Rhizobium* sp.1 como una nueva especie.
- e) Aplicar aproximación coalescente-multiespecie para delimitar los bordes de especies en rizobios usando datos MLSA y ecológicos.
- f) Concluir con la secuenciación de genes *recA* y *nodC* de aislados para redondear la prospección de los factores que afectan la distribución de los rizobios simbióticos en diferentes ecosistemas..

10. Bibliografía

1. Aanderud, Z.T., Jones, S.E., Fierer, N., y Lennon, J.T. (2015) Resuscitation of the rare biosphere contributes to pulses of ecosystem activity. *Front Microbiol* **6**: 1-11.
2. Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., y Polz, M.F. (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* **186**: 2629-2635.
3. Acinas, S.G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., y Polz, M.F. (2005) PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8966-8969.
4. Acosta-Duran, C., y Martínez-Romero, E. (2002) Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol* **178**: 161-164.
5. Aguilar, O.M., López, M.V., y Riccillo, P.M. (2001) The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *Journal of Biotechnology* **91**: 181-188.
6. Aguilar, O.M., Riva, O., y Peltzer, E. (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13548-13553.
7. Akcay, E., y Simms, E.L. (2011) Negotiation, sanctions, and context dependency in the legume-*Rhizobium* mutualism. *Am Nat* **178**: 1-14.
8. Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., y Heulin, T. (2000) Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3393-3398.
9. Alberton, O., Kaschuk, G., y Hungria, M. (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem* **38**: 1298-1307.
10. Althabegoiti, M.J., Ormeno-Orrillo, E., Lozano, L., Torres Tejerizo, G., Rogel, M.A., Mora, J., y Martínez-Romero, E. (2014) Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. *BMC Microbiol* **14**: 6.
11. Amarger, N., Macheret, V., y Laguerre, G. (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* Nodules. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 996-1006.
12. Anyango, B., Wilson, K.J., Beynon, J.L., y Giller, K.E. (1995) Diversity of Rhizobia Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Two Kenyan Soils with Contrasting pHs. *Appl Environ Microbiol* **61**: 4016-4021.
13. Aserse, A.A., Rasanen, L.A., Assefa, F., Hailemariam, A., y Lindstrom, K. (2012) Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Syst Appl Microbiol* **35**: 120-131.
14. Bailly, X., Giuntini, E., Sexton, M.C., Lower, R.P., Harrison, P.W., Kumar, N., y Young, J.P. (2011) Population genomics of *Sinorhizobium medicae* based on low-coverage sequencing of sympatric isolates. *ISME J* **5**: 1722-1734.
15. Bala, A., Murphy, P., y Giller, K.E. (2001) Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biol Biochem* **33**: 841-843.
16. Barea, J.-M., Pozo, M.J., Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761-1778.
17. Barret, L.G., Broadhurst, L.M., y Thrall, P.H. (2012) Geographic adaptation in plat-soil mutualisms: tests using *Acacia* spp. and rhizobial bacteria. *Funct Ecol* **457-468**.
18. Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M.-A., Christen, R. et al. (2009) *Rhizobium alami* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 367-372.
19. Bever, J.D., Platt, T.G., y Morton, E.R. (2012) Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annu Rev Microbiol* **66**: 265-283.
20. Bever, J.D., Broadhurst, L.M., y Thrall, P.H. (2013) Microbial phylotype composition and diversity predicts plant productivity and plant-soil feedbacks. *Ecol Lett* **16**: 167-174.
21. Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S. et al. (2012) Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E788-796.
22. Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E. et al. (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol* **197**: 300-313.
23. Bontemps, C., Rogel, M.A., Wiechmann, A., Mussabekova, A., Moody, S., Simon, M.F. et al. (2015) Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol*.
24. Borcard, D., Gillet, F., y Legendre, P. (2011) *Numerical ecology with R*: Springer-Verlag New York.
25. Bourras, S., Rouxel, T., y Meyer, M. (2015) *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and non-plant organisms. *Phytopathology*.
26. Brockwell, J., Bottomley, P., y Thies, J. (1995) Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant and Soil* **174**: 143-180.

27. Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., y Vanderleyden, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* **252**: 55-128.
28. Brown, S.D., Utturkar, S.M., Klingeman, D.M., Johnson, C.M., Martin, S.L., Land, M.L. et al. (2012) Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *J Bacteriol* **194**: 5991-5993.
29. Bruneau, A., Doyle, J.J., Herendeen, P., Hughes, C., Kenicer, G., Lewis, G. et al. (2013) Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62**: 217-248.
30. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., y Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 807-838.
31. Carelli, M., Gnocchi, S., Fancelli, S., Mengoni, A., Paffetti, D., Scotti, C., y Bazzicalupo, M. (2000) Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4785-4789.
32. Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O. et al. (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* **13**: 623-645.
33. Contreras-Moreira, B., Sachman-Ruiz, B., Figueroa-Palacios, I., y Vinuesa, P. (2009) primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Res* **37**: W95-W100.
34. Crews, T. (1999) The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. *Biogeochemistry* **46**: 233-246.
35. Chaintreuil, C., Arrighi, J.-F., Giraud, E., Miché, L., Moulin, L., Dreyfus, B. et al. (2013) Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene*. *New Phytologist* **200**: 1247-1259.
36. Dakora, F., y Phillips, D. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* **245**: 35-47.
37. Dall'Agnol, R.F., Ribeiro, R.A., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M.A., Delamuta, J.R., Andrade, D.S. et al. (2013) *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 4167-4173.
38. De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M. et al. (1994) Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **44**: 715-733.
39. de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B. et al. (1998) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **48**: 369-382.
40. de Lima, P.F., Colombo, C.A., Chiorato, A.F., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., y Carbonell, S.A. (2014) Occurrence of isoflavonoids in Brazilian common bean germplasm (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* **62**: 9699-9704.
41. De Wit, R., y Bouvier, T. (2006) 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* **8**: 755-758.
42. Denison, R.F., y Kiers, E.T. (2004) Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 187-193.
43. Dennis, P.G., Miller, A.J., y Hirsch, P.R. (2010) *Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?*
44. Diouf, D., Samba-Mbaye, R., Lesueur, D., Ba, A.T., Dreyfus, B., de Lajudie, P., y Neyra, M. (2007) Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microb Ecol* **54**: 553-566.
45. Dorado, O., Maldonado, B., Arias, D.M., Ramírez, R., y Sousa, M. (2005a) *Leguminosas de la Sierra de Huautla*. Cuernavaca, Morelos: CEAMISH, UAEM.
46. Dorado, O., Maldonado, B., Arias, D.M., Sorani, V., R., R., Leyva, E., y Valenzuela, D. (2005b) Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. In. México D.F.: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, p. 210.
47. Dorman, C.F. (2011) How to be a specialist? Quantifying specialisation in pollination networks. *Network Biology*: 1-20.
48. Downie, J.A. (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 150-170.
49. Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellin, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar, S. et al. (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E911-E920.
50. Ehinger, M., Mohr, T.J., Starceovich, J.B., Sachs, J.L., Porter, S.S., y Simms, E.L. (2014) Specialization-generalization trade-off in a *Bradyrhizobium* symbiosis with wild legume hosts. *BMC Ecol* **14**: 8.
51. Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Spain, A.M., Sheik, C., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O. et al. (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5422-5428.

52. Elliott, G.N., Chou, J.H., Chen, W.M., Bloemberg, G.V., Bontemps, C., Martinez-Romero, E. et al. (2009) *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. *Environ Microbiol* **11**: 762-778.
53. Espinosa-Alonso, L.G., Lygin, A., Widholm, J.M., Valverde, M.E., y Paredes-Lopez, O. (2006) Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* **54**: 4436-4444.
54. Ewing, B., y Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**: 186-194.
55. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., y Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**: 175-185.
56. Excoffier, L., y Lischer, H.E. (2011) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* **10**: 564-567.
57. Feng, R. (2000) Genetic diversity of rhizobia of *Medicago edgeworthii* by AFLP and RFLP analysis. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **40**: 339-345.
58. Fierer, N., y Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 626-631.
59. Gage, D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.
60. Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P. et al. (2004) Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* **70**: 153-226.
61. García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F., y Velázquez, E. (2010) *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Can J Microbiol* **56**: 657-666.
62. Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., y Young, J.P. (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2037-2048.
63. Gepts, P. (1988) Phaseolin as an evolutionary marker. In *Genetic resources of Phaseolus beans*. Gepts, P. (ed). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 215-241.
64. Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C. et al. (2007) Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science* **316**: 1307-1312.
65. Gonzalez, J.M., Zimmermann, J., y Saiz-Jimenez, C. (2005) Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. *Bioinformatics* **21**: 333-337.
66. Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D.A., Podar, M. et al. (2011) Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5934-5944.
67. Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., y Stacey, G. (2015) *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* **20**: 186-194.
68. Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J.F., y Gascuel, O. (2009) Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods Mol Biol* **537**: 113-137.
69. Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., y Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**: 307-321.
70. Han, L., Wang, E., Han, T., Liu, J., Sui, X., Chen, W., y Chen, W. (2009) Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant and Soil* **324**: 291-305.
71. Han, S.-Z., Wang, E.-T., y Chen, W.-X. (2005) Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylobacter* and *Cassia* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 265-276.
72. Harrison, P.W., Lower, R.P., Kim, N.K., y Young, J.P. (2010) Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol* **18**: 141-148.
73. Hartmann, A., Rothballer, M., y Schmid, M. (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* **312**: 7-14.
74. Haukka, K., Lindstrom, K., y Young, J.P. (1998) Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol* **64**: 419-426.
75. Hawes, M.C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., y Zhao, X. (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* **5**: 128-133.
76. Heath, K.D., y Tiffin, P. (2009) Stabilizing mechanisms in a legume-rhizobium mutualism. *Evolution* **63**: 652-662.
77. Heath, K.D., y Stinchcombe, J.R. (2013) Explaining mutualism variation: a new evolutionary paradox? *Evolution* **68**: 309-317.
78. Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N., Amarger, N. et al. (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 87-97.
79. Horner-Devine, M.C., Lage, M., Hughes, J.B., y Bohannan, B.J. (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432**: 750-753.

80. Huber, T., Faulkner, G., y Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317-2319.
81. Hungria, M., Campo, R.J., y Mendes, I.C. (2003) Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol Fert Soil* **39**: 88-93.
82. Hungria, M., Andrade, D.d.S., Chueire, L.M.d.O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F.J., y Megías, M. (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* **32**: 1515-1528.
83. Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., y Sogin, M.L. (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* **12**: 1889-1898.
84. Husson, F., Josse, J., Le, S., y Mazet, J. (2014) FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R. In.
85. Janzen, D.H. (1988) Tropical Dry Forests The Most Endangered Major Tropical Ecosystem. In *Biodiversity*. Wilson, E.O., y Peter, F.M. (eds). Washington, D.C.: National Academies Press (US), pp. 130-137.
86. Jesus, E.C., Marsh, T.L., Tiedje, J.M., y Moreira, F.M. (2009) Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME J* **3**: 1004-1011.
87. Ji, K.X., Chi, F., Yang, M.F., Shen, S.H., Jing, Y.X., Dazzo, F.B., y Cheng, H.P. (2010) Movement of rhizobia inside tobacco and lifestyle alternation from endophytes to free-living rhizobia on leaves. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 238-244.
88. Kiers, E.T., y Denison, R.F. (2008) Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annu Rev Ecol Syst* **39**: 215-236.
89. Kondorosi, E., Mergaert, P., y Kereszt, A. (2013) A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of Rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* **67**: 611-628.
90. Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., y Hugenholtz, P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* **12**: 118-123.
91. Lafay, B., y Burdon, J.J. (1998) Molecular Diversity of Rhizobia Occurring on Native Shrubby Legumes in Southeastern Australia. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3989-3997.
92. Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., y Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5111-5120.
93. Lewis, G.P. (2005) *Legumes of the World*: Royal Botanic Gardens, Kew.
94. Li, M., Li, Y., Chen, W.F., Sui, X.H., Li, Y., Jr., Li, Y. et al. (2012) Genetic diversity, community structure and distribution of rhizobia in the root nodules of *Caragana* spp. from arid and semi-arid alkaline deserts, in the north of China. *Syst Appl Microbiol* **35**: 239-245.
95. Librado, P., y Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
96. Linares-Palomino, R., Oliveira-Fihlo, A.T., y Pennington, R.T. (2011) Neotropical Seasonally Dry Forest: Diversity, Endemism, and Biogeography of Woody Plants. In *Seasonally dry tropical forests : ecology and conservation*. Dirzo, R. (ed). Washington. D.C. : Island Press, pp. 3-21.
97. Liu, J., Yang, S., Zheng, Q., y Zhu, H. (2014) Identification of a dominant gene in *Medicago truncatula* that restricts nodulation by *Sinorhizobium meliloti* strain Rm41. *BMC Plant Biol* **14**: 167.
98. Ludwig, E., y Poole, P. (2003) Metabolism of *Rhizobium* Bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 37-78.
99. López-Guerrero, M.G., Ormeno-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., y Martínez-Romero, E. (2013) Buffet hypothesis for microbial nutrition at the rhizosphere. *Front Plant Sci* **4**: 188.
100. López-Guerrero, M.G., Ormeno-Orrillo, E., Velázquez, E., Rogel, M.A., Acosta, J.L., González, V. et al. (2012) *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Syst Appl Microbiol* **35**: 353-358.
101. López-López, A., Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., y Martínez-Romero, E. (2010) *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **33**: 322-327.
102. López-López, A., Negrete-Yankelevich, S., Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., y Martínez-Romero, E. (2013) Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). *Syst Appl Microbiol* **36**: 33-38.
103. López-López, A., Rogel-Hernández, M.A., Barois, I., Ortiz Ceballos, A.I., Martínez, J., Ormeno-Orrillo, E., y Martínez-Romero, E. (2012) *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 2264-2271.
104. Louvrier, P., Laguerre, G., y Amarger, N. (1996) Distribution of Symbiotic Genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae Populations Isolated Directly from Soils. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4202-4205.

105. Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., y Knight, R. (2010) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* **5**: 169-172.
106. Lozupone, C.A., y Knight, R. (2008) Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 557-578.
107. Lynch, M.D., y Neufeld, J.D. (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol* **13**: 217-229.
108. Lloret, L., Ormeno-Orrillo, E., Rincón, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M.A., y Martínez-Romero, E. (2007) *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol* **30**: 280-290.
109. Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S. et al. (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**: 10.
110. Marco, D.E., Carbajal, J.P., Cannas, S., Perez-Arnedo, R., Hidalgo-Perea, A., Olivares, J. et al. (2009) An experimental and modelling exploration of the host-sanction hypothesis in legume-rhizobia mutualism. *J Theor Biol* **259**: 423-433.
111. Marsudi, N.D.S., Glenn, A.R., y Dilworth, M.J. (1999) Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biol Biochem* **31**: 1229-1238.
112. Martin, B.D., y Schwab, E. (2013) Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *Int J Biol* **5**: 32-45.
113. Martínez-Garza, C., Osorio-Beristain, M., Valenzuela-Galván, D., y Nicolás-Medina, A. (2011) Intra and inter-annual variation in seed rain in a secondary dry tropical forest excluded from chronic disturbance. *For Ecol Manage* **262**: 2207-2218.
114. Martínez-Romero, E. (2009) Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol* **28**: 361-370.
115. Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., y Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 417-426.
116. Martínez, E., Palacios, R., y Sánchez, F. (1987) Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bacteriol* **169**: 2828-2834.
117. Maslin, B.R., Miller, J.T., y Seigler, D.S. (2003) Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Austral Syst Bot* **16**: 1-18.
118. McInnes, A., Thies, J.E., Abbott, L.K., y Howieson, J.G. (2004) Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities - a review. *Soil Biol Biochem* **36**: 1295-1308.
119. Meyer, D., Zeileis, A., y Hornik, K. (2014) vcd: Visualizing Categorical Data. In.
120. Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M.E., Mars, M., y Amarger, N. (2002) Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol Ecol* **41**: 77-84.
121. Midgley, J.J., y Bond, W.J. (2001) A synthesis of the demography of African acacias. *Journal of Tropical Ecology* **17**: 871-886.
122. Miller, J.T., y Bayer, R.J. (2001) Molecular phylogenetics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae) based on the chloroplast *MATK* coding sequence and flanking *TRNK* intron spacer regions. *American Journal of Botany* **88**: 697-705.
123. Miranda-Sánchez, F., Rivera, J., y Vinuesa, P. (2015) Diversity patterns of *Rhizobiaceae* communities inhabiting soils, root-surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes. *Environ Microbiol*: n/a-n/a.
124. Mnasri, B., Saidi, S., Chihaoui, S.A., y Mhamdi, R. (2012) *Sinorhizobium americanum* symbiovar mediterraneanense is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Syst Appl Microbiol* **35**: 263-269.
125. Mnasri, B., Liu, T.Y., Saidi, S., Chen, W.F., Chen, W.X., Zhang, X.X., y Mhamdi, R. (2014) *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 1501-1506.
126. Montecchia, M.S., Tosi, M., Soria, M.A., Vogrig, J.A., Sydorenko, O., y Correa, O.S. (2015) Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of yungas forests to agriculture. *PLoS One* **10**: e0119426.
127. Mora, Y., Diaz, R., Vargas-Lagunas, C., Peralta, H., Guerrero, G., Aguilar, A. et al. (2014) Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5644-5654.
128. Moreira, D. (1998) Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res* **26**: 3309-3310.
129. Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O., y Defez, R. (2005) Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S *rDNA* analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Syst Appl Microbiol* **28**: 619-631.
130. Moulin, L., Bena, G., Boivin-Masson, C., y Stepkowski, T. (2004) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the Bradyrhizobium genus. *Mol Phylogenet Evol* **30**: 720-732.

131. Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X. et al. (1999) *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**: 1359-1368.
132. Njiti, C.F., y Galiana, A. (1996) Symbiotic properties and *Rhizobium* requirements for effective nodulation of five tropical dry zone acacias. *Agrofor Syst* **34**: 265-275.
133. Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B. et al. (2014) *vegan: Community Ecology*. In.
134. Oldroyd, G.E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252-263.
135. Ormeno-Orrillo, E., Rogel-Hernandez, M.A., Lloret, L., Lopez-Lopez, A., Martinez, J., Barois, I., y Martinez-Romero, E. (2012a) Change in land use alters the diversity and composition of *Bradyrhizobium* communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the tropical rain forest of Los Tuxtlas (Mexico). *Microb Ecol* **63**: 822-834.
136. Ormeno-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L.G., Ollero, F.J., Nicolas, M.F., Pains Rodrigues, E. et al. (2012b) Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* **13**: 735.
137. Papa, R., y Gepts, P. (2003) Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 239-250.
138. Papa, R., Acosta, J., Delgado-Salinas, A., y Gepts, P. (2005) A genome-wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica. *Theor Appl Genet* **111**: 1147-1158.
139. Papke, R.T., y Ward, D.M. (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 293-303.
140. Paradis, E., Claude, J., y Strimmer, K. (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290.
141. Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L. et al. (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 6548-6553.
142. Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W., y Tan, Z. (2008) *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2158-2163.
143. Pennington, R.T., Lavin, M., y Oliveira-Fihlo, A.T. (2009) Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annu Rev Ecol Syst* **40**: 437-457.
144. Pérez-Ramírez, N.O., Rogel, M.A., Wang, E.T., Castellanos, J.Z., y Martínez-Romero, E. (1998) Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol Ecol* **26**: 289-296.
145. Perret, X., Staehelin, C., y Broughton, W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 180-201.
146. Piñero, D., Martínez, E., y Selander, R.K. (1988) Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl Environ Microbiol* **54**: 2825-2832.
147. Poisot, T., Canard, E., Mouquet, N., y Hochberg, M.E. (2012) A comparative study of ecological specialization estimators. *Methods Ecol Evol* **3**: 537-544.
148. Polz, M.F., y Cavanaugh, C.M. (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3724-3730.
149. Porter, S.S., y Simms, E.L. (2014) Selection for cheating across disparate environments in the legume-*rhizobium* mutualism. *Ecol Lett* **17**: 1121-1129.
150. Pueppke, S.G., y Broughton, W.J. (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 293-318.
151. R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical computing.
152. Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M. et al. (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2484-2490.
153. Räsänen, L., Sprent, J., y Lindström, K. (2001) Symbiotic properties of sinorhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis* nodules in Sudan and Senegal. *Plant and Soil* **235**: 193-210.
154. Reed, S.C., Cleveland, C.C., y Townsend, A.R. (2011) Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annu Rev Ecol Syst* **42**: 489-512.
155. Regus, J.U., Gano, K.A., Hollowell, A.C., y Sachs, J.L. (2014) Efficiency of partner choice and sanctions in *Lotus* is not altered by nitrogen fertilization. *Proc Biol Sci* **281**: 20132587.
156. Regus, J.U., Gano, K.A., Hollowell, A.C., Sofish, V., y Sachs, J.L. (2015) *Lotus* hosts delimit the mutualism-parasitism continuum of *Bradyrhizobium*. *J Evol Biol* **28**: 447-456.
157. Relman, D.A. (2008) 'Til death do us part': coming to terms with symbiotic relationships. *Nat Rev Micro* **6**: 721-724.

158. Ribeiro, R.A., Barcellos, F.G., Thompson, F.L., y Hungria, M. (2009) Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res Microbiol* **160**: 297-306.
159. Ribeiro, R.A., Ormeno-Orrillo, E., Dall'Agnol, R.F., Graham, P.H., Martinez-Romero, E., y Hungria, M. (2013) Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Res Microbiol* **164**: 740-748.
160. Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez, J. et al. (2012) Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 1179-1184.
161. Rico-Arce, M.L. (2001) El género acacia (leguminosae, mimosoideae) en el Estado de Oaxaca, México (parte A) *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **58**: 251-275.
162. Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E., y Martínez-Romero, E. (2009) Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiol Ecol* **67**: 103-117.
163. Ripodas, C., Via, V.D., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., y Blanco, F.A. (2013) Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* **68**: 81-89.
164. Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., y Martínez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* **34**: 96-104.
165. Rogel, M.A., Bustos, P., Santamaria, R.I., Gonzalez, V., Romero, D., Cevallos, M.A. et al. (2014) Genomic basis of symbiovar mimosae in *Rhizobium etli*. *BMC Genomics* **15**: 575.
166. Rose, T.M., Henikoff, J.G., y Henikoff, S. (2003) CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* **31**: 3763-3766.
167. Rosenblueth, M., y Martínez-Romero, E. (2004) *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch Microbiol* **181**: 337-344.
168. Sachman-Ruiz, B., Contreras-Moreira, B., Zozaya, E., Martínez-Garza, C., y Vinuesa, P. (2011) primers4clades, a web server to design lineage-specific PCR primers for gene-targeted metagenomics In *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. de Bruijn, F.J. (ed): Wiley/Blackwell, pp. 441-452.
169. Sachs, J.L., Ehinger, M.O., y Simms, E.L. (2010a) Origins of cheating and loss of symbiosis in wild *Bradyrhizobium*. *J Evol Biol* **23**: 1075-1089.
170. Sachs, J.L., Kembel, S.W., Lau, A.H., y Simms, E.L. (2009) In situ phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4727-4735.
171. Sachs, J.L., Russell, J.E., Lii, Y.E., Black, K.C., Lopez, G., y Patil, A.S. (2010b) Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. *J Evol Biol* **23**: 1919-1927.
172. Sagar, K., Singh, S.P., Goutam, K.K., y Konwar, B.K. (2014) Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. *J Microbiol Methods* **97**: 68-73.
173. Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
174. Sarita, S., Sharma, P.K., Priefer, U.B., y Prell, J. (2005) Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 1-11.
175. Schlaeppli, K., Dombrowski, N., Oter, R.G., Ver Loren van Themaat, E., y Schulze-Lefert, P. (2014) Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 585-592.
176. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537-7541.
177. Schmidt, T.S., Matias Rodrigues, J.F., y von Mering, C. (2015) Limits to robustness and reproducibility in the demarcation of operational taxonomic units. *Environ Microbiol* **17**: 1689-1706.
178. Segovia, L., Young, J.P., y Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 374-377.
179. Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R., y Martínez-Romero, E. (1991) Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 426-433.
180. Silva, C., Eguiarte, L.E., y Souza, V. (1999) Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol Ecol* **8**: 277-287.
181. Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Martínez-Romero, E., y Souza, V. (2003) *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Appl Environ Microbiol* **69**: 884-893.
182. Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Souza, V., y 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.

183. Simms, E.L., y Taylor, D.L. (2002) Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integr Comp Biol* **42**: 369-380.
184. Simms, E.L., Taylor, D.L., Povich, J., Shefferson, R.P., Sachs, J.L., Urbina, M., y Tausczik, Y. (2006) An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume-rhizobium interaction. *Proc Biol Sci* **273**: 77-81.
185. Slattery, J.F., Pearce, D.J., y Slattery, W.J. (2004) Effects of resident rhizobial communities and soil type on the effective nodulation of pulse legumes. *Soil Biol Biochem* **36**: 1339-1346.
186. Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R. et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12115-12120.
187. Soto, M.J., Dominguez-Ferreras, A., Perez-Mendoza, D., Sanjuan, J., y Olivares, J. (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* **11**: 381-388.
188. Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J., y Piñero, D. (1994) Genetic Structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli Associated with Wild and Cultivated Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1260-1268.
189. Sprent, J. (2001) *Nodulation in legumes*.: Royal Botanic gardens, Kew.
190. Sprent, J.I. (1995) Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 401-407.
191. Stefan, A., Rosu, C.M., Stedel, C., Gorgan, L.D., y Efroze, R.C. (2015) RAPD-inferred genetic variability of some indigenous *Rhizobium leguminosarum* isolates from red clover (*Trifolium pratense* L.) nodules. *Acta Biol Hung* **66**: 316-325.
192. Sullivan, J.T., y Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5145-5149.
193. Sullivan, J.T., Eardly, B.D., van Berkum, P., y Ronson, C.W. (1996) Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2818-2825.
194. Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Muller, P., Ladha, J.K., y Reinhold-Hurek, B. (2001) Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3655-3664.
195. Terefework, Z., Kaijalainen, S., y Lindstrom, K. (2001) AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *J Biotechnol* **91**: 169-180.
196. Terefework, Z., Nick, G., Suomalainen, S., Paulin, L., y Lindstrom, K. (1998) Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**: 349-356.
197. Terpolilli, J.J., Hood, G.A., y Poole, P.S. (2012) What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* **60**: 325-389.
198. Thrall, P.H., Burdon, J.J., y Woods, M.J. (2000) Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian legumes: interactions within and between genera. *Journal of Applied Ecology* **37**: 52-65.
199. Thrall, P.H., Laine, A.L., Broadhurst, L.M., Bagnall, D.J., y Brockwell, J. (2011) Symbiotic effectiveness of rhizobial mutualists varies in interactions with native Australian legume genera. *PLoS One* **6**: e23545.
200. Tindall, B.J., Rossello-Mora, R., Busse, H.J., Ludwig, W., y Kampfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 249-266.
201. Toledo, I., Lloret, L., y Martinez-Romero, E. (2003) *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst Appl Microbiol* **26**: 54-64.
202. Torsvik, V., Ovreas, L., y Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**: 1064-1066.
203. Triplett, E.W., y Sadowsky, M.J. (1992) Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol* **46**: 399-428.
204. Tsai, Y.L., y Olson, B.H. (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2292-2295.
205. Tsukui, T., Eda, S., Kaneko, T., Sato, S., Okazaki, S., Kakizaki-Chiba, K. et al. (2013) The type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean plants. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1048-1051.
206. Turner, S.L., y Young, J.P. (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **17**: 309-319.
207. Uroz, S., Buee, M., Murat, C., Frey-Klett, P., y Martin, F. (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ Microbiol Rep* **2**: 281-288.
208. Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E., y Velázquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2631-2637.

209. Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J.M., y van Berkum, P. (2011) Evidence of an American Origin for Symbiosis-Related Genes in *Rhizobium lusitanum*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5665-5670.
210. van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T.A., y Eardly, B.D. (1998) *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**: 13-22.
211. van Rhijn, P., y Vanderleyden, J. (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**: 124-142.
212. Vandermeer, J.H. (1972) Niche Theory. *Annu Rev Ecol Syst* **3**: 107-132.
213. VanInsberghe, D., Maas, K.R., Cardenas, E., Strachan, C.R., Hallam, S.J., y Mohn, W.W. (2015) Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *ISME J* in press.
214. Vargas, A.A.T., y Graham, P.H. (1988) *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crop Res* **19**: 91-101.
215. Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Pineiro, J.L., Palomo, J.L., Mateos, P.F., Rivas, R. et al. (2005) The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1325-1332.
216. Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A. et al. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
217. Verástegui-Valdés, M.M., Zhang, Y.J., Rivera-Orduna, F.N., Cheng, H.P., Sui, X.H., y Wang, E.T. (2014) Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. *Syst Appl Microbiol* **37**: 605-612.
218. Vermeer, J., y McCully, M.E. (1982) The rhizosphere in Zea: new insight into its structure and development. *Planta* **156**: 45-61.
219. Vincent, J.M. (1970) *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*: [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific.
220. Vinuesa, P. (2010) Multilocus Sequence Analysis and Bacterial Species Phylogeny Estimation. In *Molecular Phylogeny of Microorganisms*. Oren, A., y Papke, R. (eds). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 41-64.
221. Vinuesa, P., Rademaker, J.L., de Bruijn, F.J., y Werner, D. (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2096-2104.
222. Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., y Martínez-Romero, E. (2005a) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* **34**: 29-54.
223. Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M.J., Izaguirre-Mayoral, M.L., Bedmar, E.J., y Martínez-Romero, E. (2005b) 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**: 702-716.
224. Vinuesa, P., Rojas-Jimenez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S.K., Prasad, B.N., Moe, H. et al. (2008) Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the asiatic continent. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6987-6996.
225. Vitousek, P.M., Menge, D.N.L., Reed, S.C., y Cleveland, C.C. (2013) *Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems*.
226. Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., y Vivanco, J.M. (2003) Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology* **132**: 44-51.
227. Wang, E., Kan, F., Tan, Z., Toledo, I., Chen, W., y Martínez-Romero, E. (2003) Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. *Arch Microbiol* **180**: 444-454.
228. Wang, E.T., Rogel, M.A., Garcia-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M.A., y Martínez-Romero, E. (1999) *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**: 1479-1491.
229. Wang, E.T., Tan, Z.Y., Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Reinhold-Hurek, B., y Martínez-Romero, E. (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.
230. Wang, E.T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X.H., Dorado, O., Chen, W.X., y Martínez-Romero, E. (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.
231. Wang, F., Wang, E.T., Wu, L.J., Sui, X.H., Li, Y., y Chen, W.X. (2011) *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 2582-2588.
232. Wang, F.Q., Wang, E.T., Zhang, Y.F., y Chen, W.X. (2006) Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. *Syst Appl Microbiol* **29**: 502-517.

233. Wickham, H. (2009) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. New York: Springer.
234. Xu, K., Zhang, X., Chen, Y., Gu, F., Zhou, D., y Tang, C. (2014) Symbiotic efficiency and genetic diversity of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Liangshan Prefecture. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **54**: 498-508.
235. Zahran, H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 968-989, table of contents.
236. Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., y Aguilar, O.M. (2010) A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* **22**: 4142-4157.
237. Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., y Steward, G.F. (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* **5**: 539-554.
238. Zézé, A., Mutch, L.A., y Young, J.P. (2001) Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ Microbiol* **3**: 363-370.
239. Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M., y Lindstrom, K. (1991) Diversity of *Rhizobium* Bacteria Isolated from the Root Nodules of Leguminous Trees. *Int J Syst Evol Microbiol* **41**: 104-113.
240. Zhang, Y.M., Li, Y., Chen, W.F., Wang, E.T., Tian, C.F., Li, Q.Q. et al. (2011) Biodiversity and Biogeography of Rhizobia Associated with Soybean Plants Grown in the North China Plain. *Appl Environ Microbiol* **77**: 6331-6342.
241. Zozaya, E. (2010) Aproximación gen y linaje específica al estudio metagenómico de comunidades de rizobios. In. Cuernavaca, Morelos: Universidad nacional Autónoma de México.
242. Zurdo-Piñeiro, J.L., García-Fraile, P., Rivas, R., Peix, A., León-Barrios, M., Willems, A. et al. (2009) Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, That Nodulate *Phaseolus vulgaris* Have Characteristics in Common with *Sinorhizobium meliloti* Isolates from Mainland Spain. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2354-2359.

11. Apéndice 1: Material y métodos adicionales

a. Medios de cultivo empleados

PY	g/L
Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	3
Agar bacteriológico	15
Agua	hasta 1L

Esterilizar en autoclave 15 min a 121° C a 15lb/in de presión. Después de esterilizado el medio agregar 1 ml de una solución de CaCl₂ 0.7M por cada litro de medio. Para PYNal20 agregar 200uL de ácido nalidíxico (20mg/mL) esterilizado por filtración.

LB	g/L
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Agar bacteriológico	15
Agua	hasta 1L

Esterilizar en autoclave 15 min a 121° C a 15lb/in² de presión.

20E	/L
KH ₂ PO ₄	68 mg
K ₂ HPO ₄	87 mg
MgSO ₄ •7H ₂ O	370 mg
CaCl ₂ •2H ₂ O	73.5 mg
KNO ₃	506 mg
FeSO ₄ •H ₂ O	6.95 mg
EDTA sal de sodio férrica	9.3 mg
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	4.84 mg
Glicerol	3.74 mL

Manitol	1.82 g
Extracto de levadura	2 g
Agua	Hasta 1L

Esterilizar en autoclave 15 min a 121° C a 15lb/in² de presión

Soluciones stock

Solución 1

6.8 g/L KH₂PO₄

8.9 g/L K₂HPO₄

Solución 2

37g/L MgSO₄

Solución 3

7.3 g/L CaCl₂

Solución 4

50.6 g/L KNO₃

Solución 5

0.695 g/L FeSO₄

0.93 g/L EDTA sal de sodio férrica

Solución 6

0.48 g/L Na₂MoO₄

Para preparar un litro de medio, mezclar en agua 10 mL de las soluciones 1,2,3,4 y 6 y 2mL de la solución 5. Posteriormente agregar:

Glicerol	3.74 mL
Manitol	1.82 g
Extracto de levadura	2g
Agar bacteriológico	15g
Agua	Hasta 1L

Esterilizar en autoclave 15 min a 121° C a 15lb/in² de presión

GRDM

(Glucose Rhizobium Defined Medium) /L

Solución de sales	10 mL
Solución de azul de bromotimol	10 mL
Solución de NH ₄ Cl	6 mL
Solución de elementos traza	1 mL
Solución de Vitaminas	1 mL
Agua	Hasta 1L

Agregar L-histidina y disolver	100mg
Ajustar pH a 6.5-7.0 con una solución 2M KOH (rojo→verde)	
Agar Bacteriológico	15 g
Si los rizobios presentan dificultad para crecer se puede agregar 0.5g/L de extracto de levadura	
Esterilizar en autoclave 15 min a 121° C a 15lb/in ² de presión	
Cuando se enfríe el medio a aproximadamente 55°C adicionar la fuente de carbono	20 mL de una solución al 20% de Glucosa esterilizada en autoclave.
Agregar solución de fosfatos estéril	10mL
Agregar cicloheximida 100 ug/mL (de un stock de 100mg/mL disuelto en etanol al 70%)	

Soluciones stock

Solución de sales	g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O	25
CaCl ₂ •2H ₂ O	2
FeEDTA (ó 0.66 g FeCl ₃ y 1.5 g EDTA)	1.5
NaCl	20
Agua	Hasta 1L
Solución de elementos traza	mg/200mL
ZnSO ₄ •7H ₂ O	3
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	40
H ₃ BO ₃	50
MnSO ₄ •H ₂ O	40
CuSO ₄ •5H ₂ O	4
COCl ₂ •6H ₂ O (0.2 g/L)	1 mL
Agua	Hasta 200 mL
Solución de vitaminas	mg/50mL

Ácido nicotínico	50
Tiamina- HCl	50
Pantotenato de calcio	100
Biotina	1 ml (1 mg/ml disuelto completamente por calentamiento antes de agregar otros ingredientes)
Agua	Hasta 50 ml. Esterilizar por filtración
Solución NH₄Cl	g/L
NH ₄ Cl	18
Solución de azul de bromotimol	g/200mL
Azul de bromotimol	0.4

b. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos utilizados en los resultados adicionales

nodA (Este trabajo)

nodAF 5' TGGAASTRTSYTGGGAAARYSA 3'

nodAR 5' CCGGGCCRTTNCGHTCDAT 3'

nifH (Vinuesa et al., 2005b)

nifH 304F 5' CGCGCYGTYATCACCTCGATC 3'

nifH 817R 5' SAKCAGCATGTCCTCSAGCTC 3'

c. Extracción de plásmidos en formato de placas de 96 pozos

1. Llenar una placa de 96 pozos con 1 mL de medio LB por pozo en placas con kanamicina 50ug/mL.
2. Inocular colonias individuales con palillos o replicador y sellar la placa con tapa porosa.
3. Incubar a 37°C por 22h a 330 rpm.
4. Si es necesario hacer un cultivo permanente colocando en placas estériles 100 ul de cultivo y 100 ul de glicerol al 50%. Guardar a -80°C.
5. Marcar la placa con nombre, número de placa, gen. Cerrarla con tapa adhesiva y centrifugar por 6 min a 4000 rpm y 10°C para sedimentar las células.
6. Remover la tapa, descartar el sobrenadante e invertir la placa sobre papel absorbente, dejar por 5 min (después de esto se puede guardar la placa a -20°C o se puede continuar con el protocolo).
7. Adicionar a cada pozo 240 uL de solución I (GET, 80mL +2mL de RNAsa 10mg/mL para dos placas), cerrar la placa con tapa adhesiva nueva y agitar con vórtex para resuspender las células.

8. Centrifugar 10 min a 4000 rpm y 10°C para sedimentar las células.
9. Retirar la tapa, descartar el sobrenadante y dejar la placa invertida en papel absorbente por 5 min.
10. Adicionar a cada pozo 160uL de solución I, sellar la placa con tapa adhesiva y agitar con vórtex para resuspender las células.
11. Adicionar a cada pozo 160uL de solución II (preparar para dos placas: NaOH 0.2N/SDS 1% → 1.6mL NaOH 5M + 4mL SDS 10% + Agua miliQ, aforar a 40 mL).
12. Cerrar la placa con tapa adhesiva y mezclar 5 veces por inversión.
13. Incubar 10 min a temperatura ambiente. Centrifugar un pulso de 9s hasta llegar a 4000 rpm para que no quede solución en la tapa.
14. Adicionar a cada pozo 160uL de solución III fría (guardar solución a 4°C). Se requieren 32mL para dos placas. Cerrar la placa con tapa adhesiva nueva y mezclar 3 veces por inversión

Solución III

19.2mL Acetato de potasio 5M
3.7 mL Acido acético glacial
9 mL Agua

15. Cerrar la placa y poner en hielo por 10 min. Centrifugar por 20 min a 4000 a 10°C.
16. Fijar con cinta adhesiva una placa Millipore (MAGVN22) sobre una placa NUNC (249944) y asegurarse de que los pozos estén bien alineados.
17. Transferir 150uL a la placa Millipore y centrifugar 6 min a 4000rpm a 10°C o hasta que todo el volumen descienda por la placa.
18. Remover y descartar la placa Millipore. Adicionar 150 uL de isopropanol al filtrado.
19. Centrifugar a 4000rpm por 30 min. a 10°C. (BAJAR LA DESACELERACIÓN DE LA CENTRÍFUGA)
20. Retirar la tapa y descartar el sobrenadante invirtiendo la placa.
21. Adicionar 300uL de etanol al 70% frío
22. Centrifugar a 4000rpm por 15 min. a 10°C. (BAJAR LA DESACELERACIÓN DE LA CENTRÍFUGA). Remover el sobrenadante
23. Adicionar nuevamente 300uL de etanol al 70% frío, centrifugar a 4000 rpm por 15 min. a 10°C, remover el sobrenadante, invertir la placa y centrifugar a 500 rpm por 1 min, a 10°C.
24. Secar la placa en el rotoevaporador (Savant) por 5 min (quitar el rotor).
25. Resuspender el DNA con 38 uL de agua miliQ, cubrir con tapa adhesiva nueva (anotar los datos de la placa) y dejar a 4°C toda la noche.
26. Guardar la placa en congelador a -20°C.

12. Apéndice 2: Colección de aislados de rizobios simbióticos

Cepa	Linaje	Año	Sitio	Leguminosa	Ecosistema	pH	Haplotipo
AFA2C1_11	Atu_c	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFA2C1_12	Atu_c	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
NX2C3_16	Atu_c	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
NX2C4_12	Atu_c	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
NX2C4_4	Atu_c	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
NX2C4_9	Atu_c	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
R2C4_3	Atu_c	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	
R2C4_4	Atu_c	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	
R2C4_6	Atu_c	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	
AYOT11	Atu_c	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
ACO2C2_1f	Ead_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
AFA2C1_9f	Ead_c	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
ACOB2_28	Ead_c	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
ACOB2_6	Ead_c	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
ACOA4_10	Ead_c	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
AFA2C1_1f	Em	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFA2C3_6f	Em	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
NOT2C2_23	Em	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
ACOB2_8	Em	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
ACOB4_3	Em	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
ACOB4_40	Em	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
AFAB1_15	Em	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	
AFAB3_18f	Em	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	
AFAB3_22f	Em	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	
NXB4_2	Em	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	
NXB5_5	Em	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	
RCB1_1f	Em	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	
RCB2_2	Em	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	
RCB3_1	Em	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	
ACOA2_8	Em	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
ACOA2_9	Em	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
ACOA4_13	Em	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
ACOA4_2	Em	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
RSA1_1	Em	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
NDS2_4	Msp	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
AFA3C1_20	Ren_l	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFAC26	Ren_l	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	
ACO1C1_3	Ret	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	Hap_1
AFA1C1_6	Ret	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_10
AFA2C1_4f	Ret	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_10
AFA2C1_5f	Ret	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_10
ACO4C1_26	Ret	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	Hap_2
AFA2C1_2f	Ret	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_2
ROT2C1_2	Ret	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
NOT2C2_10	Ret	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_6
NOT2C1_2	Ret	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_7
ROT2C1_7	Ret	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_7
ROT2C2_6	Ret	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_7
CC217	Ret	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_16

AFAB1_10	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_11
AFAB1_16	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_11
AFAB1_7	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_11
NXB5_E2	Ret	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_11
AFAB1_21	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_12
AFAB1_24	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_13
AFAB2_9	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_14
AFAB3_8f	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_15
ROTB1_4f	Ret	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_16
ROTB2_5f	Ret	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_16
ACOB1_8	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_3
ACOB3_14	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_3
ACOB3_6	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_3
ACOB4_50	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_3
AFAB1_26	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_3
AFAB3_13f	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_3
ACOB2_22	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_5
ACOB2_10	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_6
ACOB3_11	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_6
ACOB3_3	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_6
ACOB4_36	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_6
AFAB2_10	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_6
AFAB2_12	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_6
NSB2_1	Ret	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_6
NXB3_1	Ret	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_6
ACOB1_2	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_7
ACOB1_20	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_7
ACOB3_4	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_7
AFAB1_1	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_7
AFAB1_17	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_7
AFAB1_20	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_7
AFAB2_1	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_7
AFAB3_15f	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_7
AFAB3_9f	Ret	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_7
NDB2_2	Ret	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_7
NXB5_4	Ret	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_7
RDB1_4	Ret	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_79
RDB2_1	Ret	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_79
RDB2_4	Ret	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_79
ACOB1_3	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_8
ACOB3_15	Ret	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_9
NXA6_1	Ret	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_11
ACOA4_3	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_3
ACOA4_3	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_3
ACOA4_5	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_3
ACOA4_6	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_3
ACOA4_9	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_3
NXA5_3	Ret	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
RCA3_1	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RCA3_2	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RDA1_6	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RDA1_7b	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3

RDA2_7	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ROTA2_11	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ROTA4_4	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ACOA2_5	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_4
ACOA4_11	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_5
ACOA4_12	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_6
ACOA4_8	Ret	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_6
NXA12_19	Ret	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_6
RSA2_19	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_6
RSA2_2	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_6
RSA2_5a	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_6
RSA2_5bc	Ret	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_6
NXA12_2	Ret	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_75
BMT17	Ret	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	Hap_87
BMT19	Ret	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	Hap_88
R2C2_13	Rha_c	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	
ACOB3_8	Rha_c	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
ACOB4_35	Rha_c	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	
ACOA2_4	Rha_c	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
AYOO3	Rha_c	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
VNO23	Rha_c	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VNO6	Rha_c	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VNO18	Rle_l	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VRO1	Rle_l	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO18	Rle_l	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO19	Rle_l	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO28	Rle_l	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
NDS2_2	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NDS2_6	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSS1_2	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSS1_3b	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSS2_6	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST1_2	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST2_2	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST2_5	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST3_2a	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST3_3	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST3_7	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST3_9	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSTL1_4	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSTL2_2	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSTL2_3	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSTL2_4	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NT1_2b	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NT1_5	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NT3_2	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NT3_5	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NT5_4a	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NT5_4b	Rle_l	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
RDS1_3	Rle_l	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RDS1_4	Rle_l	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RDS1_5	Rle_l	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	

RDS1_7	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RDS2_7	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RDT1_2	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RDT1_6	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RDT2_1	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSS1_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSS2_2	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSS2_6	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST1_2b	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST2_4	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST3_5	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST4_2	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST4_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST4_4	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST4_5	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSTL1_1	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSTL1_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSTL1_7	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSTL2_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSTL2_4	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RSTL2_6	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT1_2	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT1_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT1_4	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT2_1	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT2_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT2_6	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT3_1	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT3_3	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT3_4	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT4_1	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT4_4b	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RT5_4	Rle_I	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
ACOO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Acoch	BPE	5,4	
AFAO1	Rleu	2010	6.Ocuit	Afarn	BPE	5,4	
AFAO12	Rleu	2010	6.Ocuit	Afarn	BPE	5,4	
AFAO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Afarn	BPE	5,4	
AYOO16	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO18	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO19	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO25	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO26	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO27	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO29	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
AYOO4	Rleu	2010	6.Ocuit	Ayoc	BPE	5,4	
BMO11	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO12	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO15	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO16	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO17	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO18	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	

BMO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO4	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO7	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO8	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
BMO9	Rleu	2010	6.Ocuit	Bmor	BPE	5,4	
CO10	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO11	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO13	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO3	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO4	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO5	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO7	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
CO9	Rleu	2010	6.Ocuit	Cacah	BPE	5,4	
COCO1	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO10	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO12	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO14	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO3	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO4	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO5	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO8	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
COCO9	Rleu	2010	6.Ocuit	Cocon	BPE	5,4	
NXO1	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO12	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO3	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO4	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO5	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO7	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
NXO9	Rleu	2010	6.Ocuit	Nxam	BPE	5,4	
PROO1	Rleu	2010	6.Ocuit	Plaev	BPE	5,4	
PROO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Plaev	BPE	5,4	
PROO3	Rleu	2010	6.Ocuit	Plaev	BPE	5,4	
PROO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Plaev	BPE	5,4	
PROO7	Rleu	2010	6.Ocuit	Plaev	BPE	5,4	
RO1	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO11	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO12	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO13	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO14	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO15	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO3	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO4	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
RO5	Rleu	2010	6.Ocuit	Rcol	BPE	5,4	
VNO10	Rleu	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VNO11	Rleu	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VNO17	Rleu	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	

VNO19	Rleu	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VNO2	Rleu	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VNO22	Rleu	2010	6.Ocuit	Vneg	BPE	5,4	
VRO12	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO21	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO24	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO26	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO29	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO6	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO7	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
VRO9	Rleu	2010	6.Ocuit	Vroj	BPE	5,4	
R2C2_16	Rma_I	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	
R2C2_17	Rma_I	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	
ROTB2_8	Rma_I	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	
ACO2C2_14f	Rms_I	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
NOTB2_1	Rms_I	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	
ROTA2_25	Rms_I	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
PROO4	Rms_I	2010	6.Ocuit	Plaev	BPE	5,4	
AFA3C1_19	Rph	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	CIAT652
ROT2C1_13	Rph	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	CIAT652
ACO2C1_4f	Rph	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	CIAT652_I1
AFA2C3_11f	Rph	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	CIAT652_I1
NX2C3_22	Rph	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	CIAT652_I1
NX2C3_23	Rph	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	CIAT652_I1
AFA3C1_7	Rph	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	CIAT652_I2
AFAB1_22	Rph	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	CIAT652
NDB2_7	Rph	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	CIAT652
NDB2_8	Rph	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	CIAT652
NOTB1_19	Rph	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	CIAT652
PROT10	Rph	2010	5.Teques	Plaev	SBCPA	8,1	IE4771
RSS2_3	Rph	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	CIAT652
RDS2_2	Rph	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	CIAT652_I3
RDT2_2	Rph	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	CIAT652_I3
RDT2_5	Rph	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	CIAT652_I3
NDS1_6	Rph	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	CIAT652_I4
NXG9	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771
RCG12	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_2
RCG2	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_2
NXG1	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG10	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG11	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG12	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG2	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG3	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG4	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG5	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG6	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG7	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
NXG8	Rph	2014	8.Guanaj	Nxam	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG1	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG10	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG11	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1

RCG3	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG4	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG5	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG6	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG7	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG8	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
RCG9	Rph	2014	8.Guanaj	Rcol	SBCAI	7,3	IE4771_I1
ACO2C1_17f	Rsp1	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	Hap_1
ACO2C1_9f	Rsp1	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	Hap_1
AFA2C3_27f	Rsp1	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_1
NX2C1_6	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_1
NX2C2_3	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_1
NX2C3_20	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_1
NX2C3_21	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_1
R2C4_12	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_1
ROT2C1_6	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_1
ACO2C1_18	Rsp1	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	Hap_2
AFA2C1_7f	Rsp1	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_3
AFA2C3_10f	Rsp1	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_3
NX2C1_10	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C1_12	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C1_15	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C1_17	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C2_5	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C3_13	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C3_3	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C3_7	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
NX2C4_23	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_1	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_11	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_13	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_18	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_3	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_4	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_5	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_6	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C1_9	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C2_15	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C2_18	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C3_12	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C3_13	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C3_15	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C3_7	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C4_11	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C4_14	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C4_5	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
R2C4_9	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_3
AFA2C1_36	Rsp1	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_4
AFA3C1_2	Rsp1	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	Hap_4
NX2C4_5	Rsp1	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	Hap_4
R2C3_14	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_8
R2C4_2	Rsp1	2012	1.consA	Rcol	SBC	4,98	Hap_9

ACOC231	Rsp1	2010	2.consB	Acoch	SBC	5,9	Hap_1
ACOC237	Rsp1	2010	2.consB	Acoch	SBC	5,9	Hap_1
AFAC218	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AFAC220	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AFAC223	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AFAC225	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AFAC226	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AFAC230	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AFAC231	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_1
AYOC27	Rsp1	2010	2.consB	Ayoc	SBC	5,9	Hap_1
CC213	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_1
CC233	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_1
NXC21	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_1
PROC211	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_1
RC210	Rsp1	2010	2.consB	Rcol	SBC	5,9	Hap_1
ACOC23	Rsp1	2010	2.consB	Acoch	SBC	5,9	Hap_3
ACOC230	Rsp1	2010	2.consB	Acoch	SBC	5,9	Hap_3
ACOC234	Rsp1	2010	2.consB	Acoch	SBC	5,9	Hap_3
ACOC238	Rsp1	2010	2.consB	Acoch	SBC	5,9	Hap_3
AFAC217	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_3
AYOC212	Rsp1	2010	2.consB	Ayoc	SBC	5,9	Hap_3
CC215	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_3
CC218	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_3
CC22	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_3
CC222	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_3
CC231	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_3
COCC223	Rsp1	2010	2.consB	Cocon	SBC	5,9	Hap_3
NXC213	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_3
NXC214	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_3
PROC217	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_3
PROC218	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_3
PROC24	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_3
PROC28	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_3
RC24	Rsp1	2010	2.consB	Rcol	SBC	5,9	Hap_3
VRC217	Rsp1	2010	2.consB	Vroj	SBC	5,9	Hap_3
AFAC21	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_4
AFAC211	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_4
AFAC212	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_4
AFAC221	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_4
AFAC24	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_4
AFAC27	Rsp1	2010	2.consB	Afarn	SBC	5,9	Hap_4
CC29	Rsp1	2010	2.consB	Cacah	SBC	5,9	Hap_4
NXC210	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC212	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC22	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC24	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC25	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC26	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC27	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC28	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
NXC29	Rsp1	2010	2.consB	Nxam	SBC	5,9	Hap_4
PROC210	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4

PROC213	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
PROC214	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
PROC215	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
PROC22	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
PROC23	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
PROC25	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
PROC29	Rsp1	2010	2.consB	Plaev	SBC	5,9	Hap_4
RC211	Rsp1	2010	2.consB	Rcol	SBC	5,9	Hap_4
RC29	Rsp1	2010	2.consB	Rcol	SBC	5,9	Hap_4
NXB5_1	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_1
ROTB1_40f	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_13
ACOB1_15	Rsp1	2012	3.agrB	Acoch	SBC	5,93	Hap_3
AFAB1_12	Rsp1	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_3
AFAB1_13	Rsp1	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_3
NDB1_3	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_3
NOTB2_13	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_3
NOTB4_8	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_3
NSB1_5	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_3
NSB2_6	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_3
NXB5_9	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_3
RDB1_6	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_3
ROTB2_1	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_3
ROTB2_17	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_3
ROTB2_9	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_3
AFAB1_6	Rsp1	2012	3.agrB	Afarn	SBC	5,93	Hap_4
NDB1_4	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NDB2_1	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NOTB1_10	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NOTB2_19	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NOTB2_23	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NOTB2_4	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NOTB2_7	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NOTB4_2	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NSB1_3	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NXB4_1	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
NXB5_2	Rsp1	2012	3.agrB	Nxam	SBC	5,93	Hap_4
RCB5_1	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_4
RCB6_2	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_4
ROTB1_10	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_4
ROTB2_7	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_4
RSB1_2	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_4
RSB1_5	Rsp1	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	Hap_4
ACOA4_1	Rsp1	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	Hap_1
AFAA1_1	Rsp1	2012	4.agrA	Afarn	SBC	5,76	Hap_3
AFAA1_3	Rsp1	2012	4.agrA	Afarn	SBC	5,76	Hap_3
NDA1_7	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
NDA1_8	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
NDA2_3	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
NOTA2_11	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
NOTA3_10	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
NOTA3_12	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
NSA1_8a	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3

NSA2_8	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_3
RCA1_1	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RCA7_1	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RCA8_1	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ROTA2_14	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ROTA2_22	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ROTA2_23	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
ROTA2_4	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RSA1_5a	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
RSA2_4a	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_3
NXA5_1	Rsp1	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	Hap_4
ROTA2_7	Rsp1	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	Hap_4
RCB8_2be	Rsp2	2012	3.agrB	Rcol	SBC	5,93	
ACOA2_2	Rsp2	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
ACOA2_6	Rsp2	2012	4.agrA	Acoch	SBC	5,76	
NOTA1_1	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NOTA1_17	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NOTA1_6	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NOTA2_27	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NOTA2_9	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NOTA3_22	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NSA1_7	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NXA2_2	Rsp2	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
RDA1_4	Rsp2	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
RDA1_5	Rsp2	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
ROTA1_3	Rsp2	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
ROTA3_3	Rsp2	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
ROTA4_7	Rsp2	2012	4.agrA	Rcol	SBC	5,76	
NX2C1_14	Rsp3	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
NX2C3_10	Rsp3	2012	1.consA	Nxam	SBC	4,98	
ACO1C1_1	Rtr	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO2C1_10	Rtr	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_8	Rtr	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
AFA1C1_5	Rtr	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFA2C1_28	Rtr	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFA2C1_33	Rtr	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
ACO2C1_5	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_1	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_16	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_19	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_2	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_23	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO4C1_29	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
ACO5C1_20	Rva_c	2012	1.consA	Acoch	SBC	4,98	
AFA1C1_1	Rva_c	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFA2C1_19	Rva_c	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AFA3C1_3g	Rva_c	2012	1.consA	Afarn	SBC	4,98	
AYOT12	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT13	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT16	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT17	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT2	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	

AYOT25	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT27	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT29	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT6	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT8	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
AYOT9	Sam	2010	5.Teques	Ayoc	SBCPA	8,1	
BMT11	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
BMT13	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
BMT14	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
BMT18	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
BMT2	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
BMT24	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
BMT5	Sam	2010	5.Teques	Bmor	SBCPA	8,1	
COCT10	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT11	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT27	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT28	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT29	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT4	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT5	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
COCT6	Sam	2010	5.Teques	Cocon	SBCPA	8,1	
CT10	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT11	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT12	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT3	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT5	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT6	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT7	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT8	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
CT9	Sam	2010	5.Teques	Cacah	SBCPA	8,1	
NXT1	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT12	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT13	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT2	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT3	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT4	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT5	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT7	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
NXT8	Sam	2010	5.Teques	Nxam	SBCPA	8,1	
PROT8	Sam	2010	5.Teques	Plaev	SBCPA	8,1	
RT1	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT12	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT24	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT25	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT4	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT7	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT8	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
RT9	Sam	2010	5.Teques	Rcol	SBCPA	8,1	
VNT11	Sam	2010	5.Teques	Vneg	SBCPA	8,1	
VNT2	Sam	2010	5.Teques	Vneg	SBCPA	8,1	
VNT3	Sam	2010	5.Teques	Vneg	SBCPA	8,1	
VNT4	Sam	2010	5.Teques	Vneg	SBCPA	8,1	

VNT5	Sam	2010	5.Teques	Vneg	SBCPA	8,1	
VNT9	Sam	2010	5.Teques	Vneg	SBCPA	8,1	
VRT13	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT14	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT15	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT19	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT21	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT24	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT25	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT5	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
VRT8	Sam	2010	5.Teques	Vroj	SBCPA	8,1	
ACOG1	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG11	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG12	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG13	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG14	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG16	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG2	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG21	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG24	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG3	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG4	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG5	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG6	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
AFAG1	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG10	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG11	Sam	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
AFAG16	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG17	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG2	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG23	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG25	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG26	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG3	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG5	Sam	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
NOTA1_12	Sfr	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NOTA1_24	Sfr	2012	4.agrA	Nxam	SBC	5,76	
NDS2_7	Ssp	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NSS1_3a	Ssp	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST1_5	Ssp	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST2_4	Ssp	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
NST3_2b	Ssp	2010	7.Chamil	Nxam	BPE	6,33	
RST1_2a	Ssp	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST2_2	Ssp	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
RST4_1	Ssp	2010	7.Chamil	Rcol	BPE	6,33	
ACOG15	Ssp2	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG22	Ssp2	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG23	Ssp2	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
ACOG26	Ssp2	2014	8.Guanaj	Acoch	SBCAI	7,3	
AFAG18	Ssp2	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG19	Ssp2	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
AFAG24	Ssp2	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	

AFAG4	Ssp2	2014	8.Guanaj	Afarn	SBCAI	7,3	
-------	------	------	----------	-------	-------	-----	--

Sitios: consA= conservado A, consB=conservado B, agrB=agrícola B, agrA=agrícola A, Teques=Tequesquitengo, Guanaj=Guanajuato, Chamil= Chamilpa

Ecosistemas: SBC= Selva Baja Caducifolia, SBCAI= Selva Baja Caducifolia Perturbada Alcalina, SBCAI= Selva Baja Caducifolia Agrícola Intensivo, BPE= Bosque de Pino y Encino

Leguminosas (variedades de frijol): Cocon= Cocona, Cacah= Cacahuate, Vneg=Vaquita negro, Vroj=Vaquita rojo, Njam= Negro Xamapa, Rcol= Rojo colorado, Bmor= Bola morado.

Leguminosas (Leguminosas mimosoides): Acoch= *Acacia cochliacantha*, Afarn= *Acacia farnesiana*, Plaev= *Prosopis laevigata*.

13. Apéndice 3: Colección de aislados de rizobios de rizoplano

Clave	Linaje	Año	Sitio	Leguminosa	pH	Haplotipo
RACOA_10	Atu_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_18	Atu_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_7	Atu_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_8	Atu_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_9	Atu_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RAFAA_1	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_10	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_12	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_13	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_15	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_16	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_17	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_18	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_19	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_2	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_20	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_21	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_22	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_23	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_24	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_3	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_4	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_5	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_6	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_7	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RAFAA_9	Atu_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RNOTA2	Atu_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RROTA5	Atu_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RACOGC_6f	Atu_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RAFAGC_9f	Atu_c	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFANC_2f	Atu_c	2012	consA	Afarn	4,98	
RNOT2C_2	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNOT2C_5	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX12	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX23	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX26	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX30	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX38	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX41	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX43	Atu_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RRC1	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC10	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC11	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC12	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC13	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC14	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC15	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC16	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	

RRC2	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC22	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC23	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC24	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC26	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC27	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC28	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC3	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC31	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC39	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC4	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC40	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC41	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC42	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC43	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC44	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC45	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC46	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC9	Atu_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RNXG4	Atu_c	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RRCG4	Atu_c	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RNOTA4f	Ead_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RNDB8	Ead_c	2012	agrB	Nxam	5,93	
RACOGC_1f	Ead_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOGC_7f	Ead_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_2f	Ead_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_6f	Ead_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_6f	Ead_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RAFAGC_2f	Ead_c	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAGC_7f	Ead_c	2012	consA	Afarn	4,98	
RACOA_6	Em	2012	agrA	Acoch	5,76	
RRSA11	Em	2012	agrA	Rcol	5,76	
RRDB3	Em	2012	agrB	Rcol	5,93	
RRSB12	Em	2012	agrB	Rcol	5,93	
RRSB8	Em	2012	agrB	Rcol	5,93	
RACOGC_9f	Em	2012	consA	Acoch	4,98	
RAFAMC_3f	Em	2012	consA	Afarn	4,98	
RRSA8	NL	2012	agrA	Rcol	5,76	
RACOA_12	Ral_I	2012	agrA	Acoch	5,76	
RNDA10	Ral_I	2012	agrA	Nxam	5,76	
RRSA10	Ral_I	2012	agrA	Rcol	5,76	
RACOB_13	Ral_I	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_18	Ral_I	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_19	Ral_I	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_20	Ral_I	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_21	Ral_I	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_7	Ral_I	2012	agrB	Acoch	5,93	
RAFAB_10	Ral_I	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_22	Ral_I	2012	agrB	Afarn	5,93	
RNDB3	Ral_I	2012	agrB	Nxam	5,93	
RROTB12	Ral_I	2012	agrB	Rcol	5,93	
RRSBA7	Ral_I	2012	agrB	Rcol	5,93	

RNOT2C_3	Ral_I	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX27	Ral_I	2012	consA	Nxam	4,98	
RNDA11	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_18
RNDA12	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_18
RNDA4	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_5
RNDA5	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_18
RNDA8	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_18
RNDA9	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_18
RNSA1	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_81
RNSA8	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_6
RNSA9	Ret	2012	agrA	Nxam	5,76	Hap_6
RRDA10	Ret	2012	agrA	Rcol	5,76	Hap_18
RRDA5	Ret	2012	agrA	Rcol	5,76	Hap_18
RRDA9	Ret	2012	agrA	Rcol	5,76	Hap_18
RRSA12	Ret	2012	agrA	Rcol	5,76	Hap_7
RRSA9	Ret	2012	agrA	Rcol	5,76	Hap_6
RACOB_15	Ret	2012	agrB	Acoch	5,93	Hap_6
RACOB_3	Ret	2012	agrB	Acoch	5,93	Hap_6
RACOB_5	Ret	2012	agrB	Acoch	5,93	Hap_2
RACOB51f	Ret	2012	agrB	Acoch	5,93	Hap_10
RACOB53f	Ret	2012	agrB	Acoch	5,93	Hap_3
RACOB55f	Ret	2012	agrB	Acoch	5,93	Hap_68
RAFAB_12	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_2
RAFAB_18	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_76
RAFAB_20	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_7
RAFAB_21	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_7
RAFAB_5	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_7
RAFAB_6	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_7
RAFAB_7	Ret	2012	agrB	Afarn	5,93	Hap_7
RNDB6	Ret	2012	agrB	Nxam	5,93	Hap_79
RNDB7	Ret	2012	agrB	Nxam	5,93	Hap_2
RNDB9	Ret	2012	agrB	Nxam	5,93	Hap_2
RNOTB12	Ret	2012	agrB	Nxam	5,93	Hap_6
RNSB11	Ret	2012	agrB	Nxam	5,93	Hap_2
RRDB6	Ret	2012	agrB	Rcol	5,93	Hap_2
RROTB10	Ret	2012	agrB	Rcol	5,93	Hap_11
RROTB11	Ret	2012	agrB	Rcol	5,93	Hap_11
RRSB10	Ret	2012	agrB	Rcol	5,93	Hap_7
RAFAGC_1f	Ret	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_77
RAFAGC_8n	Ret	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_10
RAFAMC_5f	Ret	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_78
RAFANC_4	Ret	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_10
RACOGG14	Ret	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGG26	Ret	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGG2	Ret	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGN21	Ret	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGN22	Ret	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RAFAGG19	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGG20	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGM22	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGM5	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGN16	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	

RAFAGN17	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGN7	Ret	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RACOA_11	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_13	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_15	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_17	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_19	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_20	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_3	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_4	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA_5	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RACOA1	Rha_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RAFAA_8	Rha_c	2012	agrA	Afarn	5,76	
RNOTA1	Rha_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RNOTA3	Rha_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RNOTA34f	Rha_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RNOTA5	Rha_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RNOTA6	Rha_c	2012	agrA	Nxam	5,76	
RROTA1	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA11	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA3	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA6f	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA7	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA7f	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA8f	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA9	Rha_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RACOB_1	Rha_c	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_16	Rha_c	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_17	Rha_c	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_2	Rha_c	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_4	Rha_c	2012	agrB	Acoch	5,93	
RAFAB_11	Rha_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_13	Rha_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_15	Rha_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_8	Rha_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_9	Rha_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RROTB1	Rha_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB3f	Rha_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB4f	Rha_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB5f	Rha_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB6f	Rha_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB9	Rha_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RNOT34f	Rha_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX13	Rha_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX15	Rha_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX16	Rha_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RRC36	Rha_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC48	Rha_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC6	Rha_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RROT2C_5	Rha_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RAFANC_6f	Rma_l	2012	consA	Afarn	4,98	
RACOA_14	Rms_c	2012	agrA	Acoch	5,76	

RACOA_2	Rms_c	2012	agrA	Acoch	5,76	
RRDA1	Rms_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RRSA7	Rms_c	2012	agrA	Rcol	5,76	
RACOB_14	Rms_c	2012	agrB	Acoch	5,93	
RAFAB_19	Rms_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RNOTB6	Rms_c	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNOTB7	Rms_c	2012	agrB	Nxam	5,93	
RROTB5	Rms_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB7	Rms_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RROTB8	Rms_c	2012	agrB	Rcol	5,93	
RNX11	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX14	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX17	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX20	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX29	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX42	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX7	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX9	Rms_c	2012	consA	Nxam	4,98	
RRC5	Rms_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RRC7	Rms_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RROT2C_4	Rms_c	2012	consA	Rcol	4,98	
RACOGM17	Rms_c	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGM18	Rms_c	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGM5	Rms_c	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGM6	Rms_c	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RAFAGM13	Rms_c	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGN25	Rms_c	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGN8	Rms_c	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RNSA11	Rph	2012	agrA	Nxam	5,76	
RRDA6	Rph	2012	agrA	Rcol	5,76	
RRDA7	Rph	2012	agrA	Rcol	5,76	
RRDA8	Rph	2012	agrA	Rcol	5,76	
RAFAB_16	Rph	2012	agrB	Afarn	5,93	
RNOTB2	Rph	2012	agrB	Nxam	5,93	
RROTB4	Rph	2012	agrB	Rcol	5,93	
RRSB14	Rph	2012	agrB	Rcol	5,93	
RACONC_13n	Rph	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_14	Rph	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_15n	Rph	2012	consA	Acoch	4,98	
RNOT2C_4	Rph	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX32	Rph	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX35	Rph	2012	consA	Nxam	4,98	
RNXG1	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG10	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG11	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG12	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG2	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG3	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG5	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG6	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG7	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	
RNXG8	Rph	2014	Guanaj	Nxam	7,3	

RRCG1	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG10	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG11	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG12	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG2	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG3	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG5_537	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG6_494	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG7	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RRCG9	Rph	2014	Guanaj	Rcol	7,3	
RACOGG1	Rph	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGG25	Rph	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGN10	Rph	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RACOGN9	Rph	2014	Guanaj	Acoch	7,3	
RNOTB4	Rsp1	2012	agrB	Nxam	5,93	Hap_4
RAFAGC_4f	Rsp1	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_10
RAFAMC_6f	Rsp1	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_11
RAFAMC_8f	Rsp1	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_3
RAFANC_3f	Rsp1	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_1
RAFANC_9f	Rsp1	2012	consA	Afarn	4,98	Hap_12
RROTA10	Rsp3	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA1f	Rsp3	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA3f	Rsp3	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA4	Rsp3	2012	agrA	Rcol	5,76	
RROTA6	Rsp3	2012	agrA	Rcol	5,76	
RACOB_10	Rsp3	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_11	Rsp3	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB_8	Rsp3	2012	agrB	Acoch	5,93	
RACOB50f	Rsp3	2012	agrB	Acoch	5,93	
RNOTB1	Rsp3	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNOTB10	Rsp3	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNOTB3	Rsp3	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNOTB8	Rsp3	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNOTB9	Rsp3	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNX1	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX18	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX19	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX31	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX33	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX36	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX45	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX48	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX5	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX6	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNX8	Rsp3	2012	consA	Nxam	4,98	
RNSB1	Rsp4	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNSB12	Rsp4	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNSB2	Rsp4	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNSB3	Rsp4	2012	agrB	Nxam	5,93	
RNSB4	Rsp4	2012	agrB	Nxam	5,93	
RACOA_23	Rtr	2012	agrA	Acoch	5,76	
RAFAA_11	Rtr	2012	agrA	Afarn	5,76	

RACOGC_2f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOGC_3f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_1f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_4f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_7f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_10f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_11f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_16f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_2f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_4f	Rtr	2012	consA	Acoch	4,98	
RAFAGC_3f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAGC_6f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAMC_1f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAMC_4f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAMC_7f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFANC_1f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFANC_5f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFANC_8f	Rtr	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAB_2	Rva_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_3	Rva_c	2012	agrB	Afarn	5,93	
RACOGC_4	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOGC_8	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_3n	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_5n	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACOMC_9n	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_1	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RACONC_3	Rva_c	2012	consA	Acoch	4,98	
RAFAMC_9f	Rva_c	2012	consA	Afarn	4,98	
RAFAGM14	Rva_c	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAGM23	Rva_c	2014	Guanaj	Afarn	7,3	
RAFAB_1	Sm	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_17	Sm	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_23	Sm	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_24	Sm	2012	agrB	Afarn	5,93	
RAFAB_4	Sm	2012	agrB	Afarn	5,93	
RNXG9	Sm	2014	Guanaj	Nxam	7,3	

Sitios: consA= conservado A, consB=conservado B, agrB=agrícola B, agrA=agrícola A, Teques=Tequesquitengo, Guanaj=Guanajuato, Chamil= Chamilpa

Ecosistemas: SBC= Selva Baja Caducifolia, SBCAI= Selva Baja Caducifolia Perturbada Alcalina, SBCAI= Selva Baja Caducifolia Agrícola Intensivo, BPE= Bosque de Pino y Encino

Leguminosas (variedades de frijol): Cocon= Cocona, Cacah= Cacahuete, Vneg=Vaquita negro, Vroj=Vaquita rojo, Nxam= Negro Xamapa, Rcol= Rojo colorado, Bmor= Bola morado.

Leguminosas (Leguminosas mimosoides): Acoch= *Acacia cochliacantha*, Afarn= *Acacia farnesiana*, Plaev= *Prosopis laevigata*.