

Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen 47
Volume

Número 1-2
Number

Enero-Junio 2005
January-June

Artículo:

Evolución y filogenia de *Rhizobium*

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Evolución y filogenia de *Rhizobium*

Lourdes Lloret,* Esperanza Martínez-Romero*

Vol. 47, No. 1-2
 January - March, 2005
 April - June, 2005
 pp. 43 - 60

RESUMEN. La fijación biológica del nitrógeno (diazotrofia) es un proceso muy antiguo que probablemente se originó en el Eon arqueano bajo las condiciones anoxigénicas de la atmósfera primitiva, y es exclusivo de procariontes. Sólo ocurre en Euryarchaeota y en 6 de los más de 50 phyla de Bacteria. Algunos de estos linajes coevolucionaron conjuntamente con las angiospermas estableciendo las bases moleculares de una relación de simbiosis mutualista. En el caso de los rizobios, el nitrógeno es fijado dentro de estructuras especializadas, los nódulos, que se desarrollan en la raíz o raramente en el tallo de las leguminosas. Su organogénesis se inicia con los factores de nodulación codificados en el genoma de la bacteria, en plásmidos grandes o islas de simbiosis. Los genes de la nodulación son mucho más recientes que los de la fijación de nitrógeno ya que su origen se asocia con la aparición de su hospedero, la leguminosa. La filogenia del gen *rrs* agrupa a los rizobios dentro de la división Proteobacteria, mayoritariamente en α -Proteobacteria con siete géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia*, y en β -Proteobacteria con dos géneros recientemente descritos *Burkholderia* y *Wautersia*. La topología que resulta con este gen coincide a nivel de género con la de otros genes cromosomales sin embargo, es incongruente con la de los genes simbióticos (*nif* y *nod*) debido a que por estar codificados en elementos móviles, su transferencia horizontal les ha permitido evolucionar en función de la adecuación a la planta hospedera.

Palabras clave: *Rhizobium*, simbiosis, evolución, filogenia.

ORIGEN DE LA DIAZOTROFÍA

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso antiguo

La vida incursiona en el ensamblaje de las primeras formas de vida que darían origen a las células más primitivas “los progenotes”²⁰⁵ a partir del enfriamiento de las primeras rocas hace 3,700 millones de años (m.a.).¹⁴⁶ Este periodo ha sido llamado Eon Arqueano y también es conocido como la edad de la anaerobiosis pues todos los procesos se llevaron a cabo dentro de la atmósfera primitiva desprovista de oxígeno.⁵ Probablemente, fue en el Eon Arqueano donde los primeros sistemas informativos y algunos procesos metabólicos hicieron su aparición: ácidos nucleicos y síntesis de proteínas, reparación de DNA, fermentación, glicólisis, biosíntesis de enlaces ester y eter en los lípidos,

ABSTRACT. Nitrogen fixation is an ancient process that may have originated in the archaean Eon under the primitive atmosphere anoxygenic conditions. Diazotrophy is an exclusive process of prokaryotes, only Euryarchaeota and 6 of over 50 Bacteria phyla have diazotrophs lineages. Some of them coevolved with flowering plants for the establishment of molecular bases of a mutualistic symbiosis relationship. In rhizobia, nitrogen fixation occurs inside the nodules, special structures on the roots or stems of legumes. Nodule organogenesis starts with the bacterial nodulation factors (Nod factors) codified in large plasmids or symbiotic islands in the bacterial genomes. Nodulation genes had a more recent origin than the nitrogen fixation ones because the origin of the *nod* genes is associated with the origin of the hosts. The *rrs* phylogeny groups rhizobia in seven genera of the α -Proteobacteria: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* and *Devosia*, and two genera recently described in β -Proteobacteria: *Burkholderia* and *Wautersia*. The phylogenies obtained with other chromosomal genes are similar at the genus level, but it is incongruent with the symbiotic gene (*nif* & *nod*) phylogeny, because horizontal gene transfer has allowed their evolution in relation to the legume host fitness.

Key words: *Rhizobium*, symbiosis, evolution, phylogeny.

metanogénesis, formación de pared celular, ciclo del ácido tricarbóxico para síntesis de ATP, la fotosíntesis anaeróbica y las rutas para la fijación del dióxido de carbono y del nitrógeno.⁹⁶

El nitrógeno biológicamente disponible es llamado también nitrógeno fijado y es esencial para la vida. La capacidad de fijar nitrógeno (diazotrofia) es exclusiva de los procariontes^{135,216} y radica en el complejo enzimático de la nitrogenasa. Esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno,²¹⁹ por lo tanto, las primeras nitrogenasas debieron de haberse originado antes de que la condición reductora de la atmósfera primitiva se transformara en oxigénica por la acumulación de O₂, como producto final de la fotosíntesis bacteriana. En la formación “Gunflint Iron”, Ontario, que data de hace 2,000 m.a., se han encontrado estromatolitos con microfósiles diversos entre los que están incluidas las cianobacterias asociadas a óxidos de hierro.^{82,148} La evidencia geológica de la presencia de hierro oxidado en estas formaciones, sugiere que el oxígeno ya era abundante en la Tierra hace 2,000 m.a.²⁴ Así, la aparición de los diazótrofos más antiguos podría ubicarse en algún momento dentro del

* Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Eon Arqueano, anterior a la acumulación del oxígeno molecular (Fig. 1). La nitrogenasa pudo participar originalmente en un proceso de respiración anaerobia análogo a la reducción de sulfatos que se observa en bacterias reductoras de sulfato.¹²⁸ En la atmósfera primitiva reductora, era necesario el gasto de ATP para asegurar la expulsión de H₂,^{10,56} por lo que es probable que la nitrogenasa surgiera como un mecanismo para disipar poder reductor. Debido a que la nitrogenasa reduce además de nitrógeno molecular otros sustratos como acetileno, azidas y cianuros, componentes que se encontraban en la atmósfera primitiva, probablemente la función ancestral de esta enzima pudo haber sido también la detoxificación de derivados del HCN.¹⁵³ La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en simbiosis con las plantas, debió de originarse mucho tiempo después.^{33,216} Los diazótrofos antiguos recorrieron un largo camino evolutivo conviviendo en la rizósfera como epífitos o endófitos, quizá desde la aparición de las primeras plantas terrestres, hace aproximadamente 400 m.a. Durante este largo periodo, las líneas diazótroficas de procariontes se diversificaron y lograron establecer relaciones simbióticas con algunos linajes de plantas.

Biodiversidad de los diazótrofos

Los procariontes fijadores de nitrógeno (diazótrofos) están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, como células individuales o en filamentos, en vida libre y en simbiosis.^{135,216} La FBN en arqueas ocurre solamente dentro del reino Euryarchaeota en las divisiones Methanosarcinales,¹⁵² Methanobacteriales¹⁵⁷ Halobacteriales, y Methanococcales, y en Bacteria ocurre en 6¹³⁵ de los más de 50 phyla bacterianos descritos hasta el momento¹³⁴ que incluyen organismos cultivables en los que la fijación de nitrógeno ha sido demostrada ya sea bioquímicamente, o por la presencia del operón *nifHDK* que codifica para el complejo nitrogenasa, por la amplificación de su secuencia por PCR o su identificación por homología en la anotación de los genomas secuenciados. Este recuento corresponde a diazótrofos que han sido cultivados, sin embargo, existen otros phyla que potencialmente podrían ser descritos dentro de la gran cantidad de secuencias ambientales de diazótrofos no cultivables que han sido reportados por la amplificación del gen *nifH*.^{108,118,122,179} Los 6 phyla de diazótrofos bacterianos son: las bacterias verdes del azufre, cianobacterias, Gram positivas de bajo y alto contenido de G+C, Spirochaetes,⁸⁹ Firmicutes y Proteobacteria, siendo esta última, la división bacteriana más abundante^{70,134} y a la que se afilian todos los rizobios. La fijación de nitrógeno es suficientemente compleja como para haber surgido

más de una vez en la evolución. La parafilia de los genes *nifD* y *nifK* de la arquea *Methanobacterium thermoautotrophicum* y la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*,²⁰⁷ sugiere un evento de duplicación muy temprano de la nitrogenasa ancestral que precedió a la divergencia de los linajes de Bacteria y Arquea.¹⁵ La amplia distribución de la diazotrofia podría interpretarse con un enfoque clonal suponiendo que la capacidad de fijar nitrógeno haya sido un carácter ancestral que fue perdido posteriormente al cambio de la atmósfera primitiva de anoxigénica a oxigénica. Otra interpretación plantearía la participación de la transferencia horizontal de la información de la FBN de algún linaje a otros linajes próximos o distantes que la integraron como parte de sus genomas como una adecuación a estilos de vida para los que representara una ventaja adaptativa. En el genoma de *Chlorobium tepidum* TSL que pertenece a la división de bacterias verdes del azufre, se reporta un ordenamiento del operón de los genes de fijación de nitrógeno muy similar al de la arquea *Methanobacterium thermoautotrophicum*, sugiriendo que el grupo completo de genes pudo haber sido transferido lateralmente entre estos dos linajes.⁴²

La FBN en asociación simbiótica incluye tres grupos de interacciones:¹⁰⁷ 1. los heterocistos de las cianobacterias que ocupan tejidos de hepáticas, helechos,¹⁸⁸ cícadas¹ y dicotiledoneas; 2. actinomicetos representados por *Frankia*,⁷⁹ que forma nódulos con muchas plantas no leguminosas de varias familias que incluyen a los géneros *Alnus*^{50,154} y *Prusis*;⁷ 3. Los rizobios que forman nódulos en muchas leguminosas,^{104,115,151,209,217,218} y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia*, miembro de la familia Ulmaceae.¹⁷⁵ Dentro de esta gran diversidad de diazótrofos, el interés de esta revisión se centra en el origen y evolución de los rizobios, Proteobacterias que establecen simbiosis con las plantas leguminosas.

COEVOLUCIÓN RIZOBIO-LEGUMINOSA

La nodulación, ¿carácter ancestral en angiospermas?

Los nódulos son las estructuras especializadas donde se lleva a cabo la FBN que algunas familias de angiospermas han desarrollado, principalmente en el cortex radicular y excepcionalmente en tallo como es el caso de *Sesbania rostrata*³⁸ y *Aeschynomene* sp.² Las plantas con flor que han coevolucionado con diazótrofos actinorríficos o con los rizobios para establecer su relación simbiótica pertenecen a 11 familias que a excepción de *Gunnera*,^{1,188} se agrupan dentro del clado Rosidae con la filogenia molecular del gen *rbcL* que codifica para parte de la enzima RUBISCO en el cloroplasto.^{35,36156} Este agrupamiento indica que probablemente la predisposición a la formación

de nódulos surgió una sola vez en las angiospermas y podría ser considerado como un carácter ancestral que se ha conservado o perdido en ciertos linajes particulares de angiospermas, sin embargo, la distribución tan dispersa de familias y géneros nodulantes dentro de este linaje, indica orígenes múltiples de la de nodulación.¹⁵⁶ De las 10 familias nodulantes de Rosidae, 8 son noduladas por actinomicetos (Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datiscaaceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae y Rosaceae), y las dos familias restantes Ulmaceae y Fabaceae (leguminosas) son noduladas por rizobios. La nodulación prosperó ampliamente dentro de las leguminosas, se encuentra presente en la mayoría de sus miembros que se especializaron en la asociación exclusiva con rizobios que a su vez también establecieron una simbiosis exclusiva con las leguminosas, a excepción de *Parasponia*, único de los 18 géneros que forman a la familia Ulmaceae que es capaz de nodular.¹⁷⁵ Las leguminosas son una familia grande y diversa de plantas con flor dicotiledoneas que ocupa el tercer lugar en número de especies, con 650 genera y más de 18,000 especies descritas divididas en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae.³ La filogenia molecular de las leguminosas construida con la comparación de las secuencias del gen *rbcL* agrupa a las subfamilias Papilionoideae y Mimosoideae como grupos monofiléticos, y a la subfamilia Caesalpinioideae como un grupo polifilético. La nodulación está presente en todas las subfamilias pero es menos frecuente en la subfamilia Caesalpinioideae.³⁵ La subfamilia Papilionoideae es la que presenta todos los tipos de nódulos: indeterminado (conserva el meristemo), determinado (no conserva el meristemo) y el tipo de *Aeschynomene* sp.⁵⁸ Los dos últimos, sólo están presentes en algunas líneas de la subfamilia Papilionoideae, por lo que son consideradas como especializaciones y tipos más modernos de nódulos.³⁶ Aunque la nodulación es abundante en las dos subfamilias monofiléticas Papilionoideae y Mimosoideae, también existen ejemplos de especies no nodulantes. La presencia y ausencia de especies nodulantes dentro de las tres subfamilias indica que la nodulación surgió varias veces en la filogenia de las leguminosas y se ha perdido en algunos linajes.¹³¹ Por ejemplo, dentro del género *Acacia*, miembro de Mimosoideae, *A. pentagona* no tiene la capacidad de nodular⁶³ y algunas especies de este género lo hacen en forma promiscua, como es el caso de *Acacia seyal* que es nodulada por rizobios de rápido y lento crecimiento.³⁷

Los factores de nodulación como determinantes del rango de hospedero

Debido a que las plantas no son móviles, el primer contacto lo inicia la bacteria de la rizósfera que se aproxima a

la raíz. A principios del siglo antepasado, Lorenz Hiltner demostró que existía un compuesto que inducía la deformación de los pelos radiculares en *Pisum sativum* a partir de un filtrado de nódulo, libre de bacterias.⁶⁷ Las sustancias responsables de la inducción de la formación de los nódulos son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados producidos por los rizobios, y son llamados factores de nodulación (factores Nod).⁸⁷ Su estructura fue primeramente descrita en *Rhizobium meliloti* (clasificado actualmente como *Sinorhizobium meliloti*) y posteriormente han sido descritos en otros rizobios. Se componen de una estructura básica y modificaciones o decoraciones en los extremos reductor y no reductor. La estructura básica es sintetizada por el producto de los genes *nodABC* que están presentes en todos los rizobios, y sus decoraciones incluyen: metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones que pueden variar en cada especie y biovariedad de rizobio. A las decoraciones de los factores Nod se les atribuye la especificidad o promiscuidad de la interacción con su hospedero,¹⁴ así como también al regulador, el gen *nodD*,^{16,68,69,160} cuyo número y especificidad por su hospedero es variable.¹⁸⁵ En los trópicos se ha descrito una gran variedad de especies de leguminosas¹⁶² y muchas de ellas son promiscuas en su relación con sus simbioses los rizobios. La subfamilia Papilionoideae, contiene a las especies más promiscuas de leguminosas dentro de la tribu Phaseolae que incluye a *Vigna unguiculata*,⁸⁸ *Phaseolus vulgaris*,^{65,109} *Lablab purpureus* de la que fue aislada la especie de más amplio rango de hospedero *Sinorhizobium* sp. NGR234,^{132,176} y *Macroptilium atropurpureum* que ha sido utilizada como planta prueba para la nodulación de rizobios no caracterizados.^{12,136} La subfamilia Mimosoideae, también contiene especies promiscuas como el género *Acacia*. Especies de *Acacia* nativas de África y América son noduladas por representantes de *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*.^{28,29,37} De los nódulos de *Leucaena* han sido aisladas cepas de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* en México¹⁹⁰ y Brasil.¹¹³ La coevolución de los rizobios y las leguminosas ha llevado a la especialización de los factores Nod que han generado una amplia gama de decoraciones para adecuarse a su hospedero en algunos casos con alta especificidad como el caso de *Azorhizobium caulinodans* que sólo nodula a *Sesbania rostrata*,³⁸ y en el extremo opuesto se encuentra la cepa con la mayor promiscuidad reportada, *Sinorhizobium* sp. NGR234 que abarca un amplio rango de hospederos, nodula a 232 (51%) de 452 leguminosas probadas.¹³² Probablemente la forma ancestral de los factores Nod fue promiscua, y conforme el rizobio fue coevolucionando con su hospedero, el juego de señales de la pareja se fue especializando para producir las relaciones de promiscuidad o especificidad entre ambos miembros de la pareja de sim-

biontes.¹⁴ Las leguminosas también pueden ser específicas por un simbionte en particular. Ejemplos de leguminosas no promiscuas son *Galega officinalis* y *G. orientalis*, noduladas solamente por *Rhizobium galegae*,⁹⁰ *Vicia faba* por *R. leguminosarum* bv. *viciae*¹³⁸ y *Medicago* sp. por *Sinorhizobium meliloti*. Estos rizobios con relaciones específicas con su hospedero presentan poliinsaturación en los ácidos grasos como requisito para la acilación de los factores de Nod pero no existe correlación entre su posición filogenética, sin embargo, sus hospederos las leguminosas si pertenecen a tribus relacionadas filogenéticamente dentro de la subfamilia Papilionoideae²¹⁰ por lo que la poliinsaturación del grupo acilo de los factores Nod puede ser considerado como una especialización en algunos representantes herbáceos de esta subfamilia,³² y por el contrario, la promiscuidad podría ser considerada como un carácter ancestral.¹³ Aunque la planta hospedera sea promiscua, existen preferencias por un determinado tipo de decoración en el factor Nod del rizobio, por ejemplo, a pesar de que la planta de frijol es capaz de reconocer un amplio rango de estructuras de factores Nod, existe una jerarquía de preferencias donde la acetil fucosa en el extremo reductor es preferida sobre las otras modificaciones.^{26,83} La enorme diversidad de factores Nod ha sido tema de varias revisiones.^{27,31,129,185} Más de 50 genes han sido identificados con relación a la nodulación involucrados en la biosíntesis, modificación, regulación, transporte y secreción de los factores Nod. El término "genes *nod*" se aplica en forma genérica a todos los genes involucrados en la nodulación,³⁴ conforme han sido identificados, se les han asignado letras del alfabeto. El número de letras del alfabeto no fue suficiente para nombrarlos a todos y fueron necesarias nuevas rondas y otra designación de código de tres letras. Los genes *nod* corresponden a la primera ronda del alfabeto, los genes *nol* son la segunda ronda, y actualmente los genes *noe* están siendo descritos con la tercera.

ORIGEN DE LOS GENES *nod*

Ubicación de los genes simbióticos

Los genes involucrados en la FBN son más antiguos que los genes *nod*, pero en su historia más reciente, probablemente ambos evolucionaron juntos en los rizobios agrupándose en operones que se localizan en bloques cercanos unos de otros cuya ubicación puede ser cromosomal en islas simbióticas o extracromosomal en los plásmidos simbióticos. Algunos de los genes de la nodulación parecen haber sido reclutados del cromosoma y codifican para funciones celulares comunes. Ejemplos de estos genes cromosomales reclutados en los plásmidos simbióticos son *nodM*, *nodC*, *nolE* y *nodF*. NodM homóloga a GlmS, es la glucosamino

sintetasa que cataliza la biosíntesis de glucosamina-6-P, no obstante, NodM es una glucosamino sintetasa específica para la nodulación.⁹⁷ NodC tiene actividad de β -glucosil transferasa y es una proteína de membrana interna similar a otras glucosil transferasas pero en la nodulación esta actividad interviene en la construcción de la estructura básica de los factores Nod.⁶ Los genes *nodE* y *nodF* codifican para enzimas que intervienen en la síntesis y acarreamiento de ácidos grasos. NodE presenta homología a β -ceto cintasas y NodF es una proteína acarreadora de grupos acilos y ambas enzimas se han especializado en la síntesis de ácidos grasos α - β insaturados de los factores Nod de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *Sinorhizobium meliloti*.¹⁶¹ En los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* y en algunas cepas del género *Mesorhizobium*, los genes de la nodulación se encuentran codificados en plásmidos simbióticos.¹⁵¹ En *Bradyrhizobium* los genes de simbiosis son cromosomales y se encuentran agrupados en un fragmento de alrededor de 400 Kpb⁵⁵ que podría ser móvil.¹¹⁰ En *Mesorhizobium* existen las dos condiciones: los genes simbióticos están codificados en plásmido en *M. amorphae*¹⁹¹ y *M. huakuii*,⁵⁹ o en el cromosoma agrupados dentro de una isla de simbiosis móvil que ha sido descrita en las cepas de *M. loti* ICMP3153, *M. loti* R7A^{167,168} y *M. huakuii* MAFF303099.⁷⁶ La organización de algunos genes involucrados en la fijación de nitrógeno en los rizobios se asemeja a la de *Klebsiella pneumoniae*, especie fijadora de nitrógeno en vida libre, pero a diferencia de *K. pneumoniae*, en rizobios se encuentran grupos de genes regulatorios especiales,⁴⁴ que al igual que los de fijación están codificados en plásmido¹⁰² e islas simbióticas flanqueadas por elementos de inserción.¹⁶⁸ La organización de los genes simbióticos ocupando *loci* cercanos agrupados juntos en plásmidos, islas de simbiosis o dentro de un solo bloque en el cromosoma, lleva a suponer que los genes de la fijación de nitrógeno y de la nodulación en algún momento integraron su función en bacterias epífitas o endófitas de raíz para establecer la relación simbiótica con su hospedero.¹⁹³

Los genes simbióticos, el paquete genético flexible

La pérdida o ganancia de material genético modela la evolución de los genomas microbianos. Parte de la información genética es indispensable para los genomas pero otra parte puede ser intercambiada, perdida o ganada por transferencia horizontal.¹²¹ El genoma básico está restringido a genes que codifican para funciones básicas como la traducción, transcripción, regulación y metabolismo primario. En contraste, la mayoría del material transferido horizontalmente es parte de un paquete genético flexible⁹ que contiene genes que son útiles para la adaptación a un determinado medio ambiente pero que no son indispensa-

bles para la sobrevivencia del procarionte. En bacterias patógenas este concepto puede ser aplicado al conjunto de genes involucrados en la invasión y virulencia que determinan su patogenicidad, y en rizobios de manera análoga se podría aplicar al conjunto de genes que le permiten establecer su relación simbiótica con las leguminosas.⁶² Los genes de patogenicidad o de simbiosis se encuentran dentro de plásmidos o en islas de patogenicidad⁶¹ o de simbiosis^{49,168} que funcionan como vehículos de transferencia horizontal de la información genética entre diferentes fondos genéticos. Los genes de patogenicidad o simbiosis pueden perderse o adquirirse por transferencia horizontal, por lo que forman parte del paquete genético flexible⁹ de los rizobios, y la selección diferencial de su permanencia, lleva a la divergencia entre los estilos de vida de patógeno y simbiote.¹²¹ Ninguno de los genes de la región T-DNA, codificados en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tiene ortólogos en el genoma de *S. meliloti*⁴⁹ y este plásmido carece de los genes del complejo nitrogenasa y de muchos genes de la nodulación, sin embargo, conserva a los genes *nodL*, *nodX* que codifican para acetiltransferasas y *nodM* que codifican para la función homóloga de la glucosaminosintetasa.²⁰⁶

Expresión de los plásmidos de los rizobios en diferentes fondos genéticos

La habilidad de transferirse de los genes de simbiosis facilitada por su ubicación en plásmidos e islas de simbiosis ha sido probada en condiciones de laboratorio^{101,141} y de campo en poblaciones agrícolas.¹⁶⁶ Los análisis de genética de poblaciones de rizobios asociados a frijol indican que la transferencia de los plásmidos es extensa y presenta un patrón panmítico, en distintos fondos genéticos.¹⁵⁹ La pérdida y readquisición de los plásmidos simbióticos de *R. leguminosarum* ocurre con frecuencia en el campo y puede ser monitoreada principalmente por la pérdida o ganancia del fenotipo simbiótico.⁸⁵ Es posible aislar cepas no simbióticas (saprofíticas) de *Rhizobium etli* (antes designado *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) que no portan el plásmido simbiótico^{155,149} lo que indica que su presencia no es esencial para la sobrevivencia de las cepas que habitan en el suelo, y las cepas que sí lo portan, lo pierden con alta frecuencia. Cuando a las cepas saprofíticas de *R. etli* se les introduce el plásmido simbiótico, adquieren la capacidad de ser simbiotes¹⁴⁹ y su capacidad competitiva requiere de la interacción de varios replicones.¹¹ La presencia de genes compartidos responsables de la replicación de los plásmidos de distintos géneros de rizobios y *Agrobacterium* es evidencia de la factibilidad del tránsito de genes del paquete genético flexible que comparten las distintas especies. Los genes de replica-

ción *repABC* de los plásmidos Ti de *A. tumefaciens* y Ri de *A. rhizogenes*²⁰⁶ son muy similares a los del plásmido simbiótico de la cepa de amplio rango de hospedero sp. NGR234.⁴⁸ Esto sugiere que probablemente, los plásmidos simbióticos y tumorigénicos derivaron de un mismo tipo de plásmido. La expresión de genes involucrados con la nodulación ha sido probada en fondos genéticos de distintos géneros de rizobios incluyendo a *Agrobacterium*. El mismo fondo genético de *A. tumefaciens* le permite expresar dos tipos distintos de plásmidos: el plásmido Ti que porta genes de patogenicidad que vuelve a la bacteria en patógeno, y los plásmidos simbióticos. *A. tumefaciens* es capaz de nodular a *Phaseolus vulgaris* cuando le es introducido por conjugación el plásmido simbiótico de *Rhizobium tropici* (antes designado *Rhizobium phaseoli* tipo II).¹⁰¹ *Sinorhizobium adhaerens*,²⁰⁰ (antes clasificado como *Ensifer adhaerens*),¹⁷ bacteria del suelo que se adhiere a otras bacterias y las lisa, se vuelve capaz de nodular a *Phaseolus* cuando se le introduce por conjugación el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299.¹⁴¹ Cuando el plásmido simbiótico pNGR234 le es transferido a *Agrobacterium tumefaciens* también le confiere la capacidad de transformarse en nodulante. La expresión de genes de simbiosis en *Agrobacterium* es uno de los varios argumentos en los que se basa la propuesta de su reclasificación dentro del género *Rhizobium*.²¹³

En la historia de la taxonomía de los rizobios, algunas especies han sido nombradas con el epíteto de especie de acuerdo al hospedero al que nodulan pero su genoma es muy similar y por lo tanto se han reclasificado como biovariedades de una misma especie. El primer ejemplo de reclasificación por biovariedad fue el caso de *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifolii* y *R. phaseoli*, tres especies que actualmente corresponden a tres biovariedades: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* que nodulan trébol, haba y frijol respectivamente.⁷⁵ En *R. etli* también se han definido biovariedades: *R. etli* bv. *phaseoli* y *R. etli* bv. *mimosae* que nodulan al frijol y *Mimosa* sp respectivamente.¹⁹² Dentro del género *Sinorhizobium* también han sido descritas biovariedades en *S. saheli* y *S. terangaie*. Ambas especies tienen cepas que se han especializado en nodular a los géneros *Acacia* y *Sesbania*.⁹²

La nodulación en Proteobacteria: ¿es un carácter ancestral?

La capacidad de los diazotrofos de establecer simbiosis con las leguminosas ha sido descrita mayoritariamente en las α -Proteobacteria,^{104,105,151,217} sin embargo, el hallazgo relativamente reciente de cepas nodulantes dentro de β -Proteobacteria¹¹⁵ amplió el inventario de dia-

zótrofos capaces de nodular dentro de la división Proteobacteria con la descripción de dos nuevas ramas de simbioses dentro de los géneros *Burkholderia* y *Wautersia* (anteriormente *Ralstonia*¹⁸⁴), representados por *Burkholderia tuberum*, *B. phymatum*¹⁸³ y *Ralstonia taiwanensis*²² (recientemente renombrada como *Wautersia taiwanensis*).¹⁸⁴ La expansión de la presencia de genes de la nodulación dentro de la subdivisión β -Proteobacteria plantea dos hipótesis de su posible origen. Un enfoque clonal llevaría a suponer que la capacidad de los rizobios de nodular a las leguminosas pueda ser quizá un carácter ancestral dentro de la división Proteobacteria y que aún estén por descubrirse nuevas especies y géneros de simbioses dentro de β -Proteobacteria,²³ y porqué no extrapolar esta suposición para pensar que exista la posibilidad de encontrar rizobios también dentro de las γ -Proteobacterias, que por estructura primaria y secundaria del 16S rRNA, son los parientes más cercanos de las β -Proteobacterias. El otro enfoque explicaría la capacidad de nodular como el resultado de un evento o suma de eventos de transferencia lateral de los genes requeridos para la simbiosis que provocaran un salto cuántico en la evolución⁵⁷ de algunos linajes dentro de las proteobacterias. La presencia de diazótrofos dentro de α y β -Proteobacteria y la ubicación de la información genética de la simbiosis en “paquetes” de genes de fijación de nitrógeno y nodulación dentro de vehículos de transferencia horizontal, lleva a suponer la factibilidad de la adquisición de la capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis por transferencia lateral y no por la vía de la herencia, quizá proveniente de una α -Proteobacteria, subdivisión en la que ha sido descrita hasta el momento la mayor diversidad de géneros y especies que poseen la capacidad de establecer simbiosis con las leguminosas.

EVOLUCIÓN Y FILOGENIA DE LOS LINAJES DE RIZOBIOS

Tiempo de origen e identidad

Utilizando moléculas ancestrales y conservadas como relojes moleculares se pueden hacer estimaciones del tiempo de divergencia entre los linajes en función de los cambios que han ocurrido en sus secuencias.^{54,130} Estas estimaciones asumen que la tasa de cambio en todos los linajes es parecida, pero no todas las moléculas ni todos los linajes evolucionan a la misma tasa de cambio, por lo que solamente representan aproximaciones del tiempo de divergencia entre los linajes.²⁰²

La duplicación de genes antes de la separación entre dos linajes ha sido utilizada para ubicar su tiempo de divergencia.⁷¹ El gen ancestral de la glutamino sintetasa (GS) se duplicó antes de la separación entre procariontes y eucarion-

tes¹³⁰ y la comparación entre los dos genes parálogos GSI y GSII ha permitido calibrar el tiempo de divergencia entre los linajes que los contienen, por lo que pueden ser utilizados como cronómetros moleculares que datan el tiempo de divergencia entre los linajes. Con esta pareja de genes parálogos se ha estimado el tiempo de separación de los linajes de rizobios de α -Proteobacteria¹⁷⁷ (Fig. 1). Los tiempos estimados para los dos genes son muy parecidos en los rizobios de rápido crecimiento y alejados de *Bradyrhizobium*. La GSII ubica como linajes más recientes a *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, y *Mesorhizobium* junto con *Bradyrhizobium* como los linajes más antiguos. Con la GSI la separación de *Rhizobium*-*Sinorhizobium*-*Mesorhizobium* ocurre al mismo tiempo y *Bradyrhizobium* se ubica como el linaje más antiguo. *Bradyrhizobium* es el único rizobio que ha conservado la capacidad de fotosintetizar y de fijar nitrógeno en condición de vida libre y en simbiosis a diferencia de los demás géneros de rizobios que sólo son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis,¹¹² lo que también sugiere que *Bradyrhizobium* podría ser el linaje más cercano a la forma ancestral.¹⁰⁴

Otro criterio para estimar el tiempo de la separación entre *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Fig. 1) es la estimación de la tasa de sustitución de aminoácidos de los genes ortólogos¹¹⁴ a partir del cálculo de los genes compartidos entre los cromosomas de *Sinorhizobium meliloti* 1021⁴⁹ y *Mesorhizobium huakuii* MAFF303099,⁷⁷ (originalmente considerado como *M. loti*).¹⁷⁸ La divergencia entre ambos linajes fue estimada en 400 m.a., que es cercana a la estimación basada en la GSII de 324 m.a.¹⁷⁷ Los tiempos calculados a partir de las GSs y de genes ortólogos sintéticos, datan la separación de los linajes de los rizobios más antiguos (*Bradyrhizobium*) y más recientes (*Sinorhizobium*) entre 553 y 203 m.a., mucho tiempo antes, no sólo de la aparición de las leguminosas 70 m.a. atrás, sino también de las plantas con flor hace más de 150 m.a.^{98,99} La posibilidad de que los rizobios comenzaran a divergir antes de la existencia de las leguminosas e incluso de la aparición de las angiospermas, sugiere que el último ancestro común de los rizobios ya existía antes del origen de su hospedero (Fig. 1). Tal vez los últimos ancestros comunes diazótrofos de los rizobios coexistieron con las plantas asociados a sus raíces sólo como epífitos o endófitos desde la aparición de las primeras plantas terrestres hace 400 m.a. y convivieron con ellas durante 250 m.a. hasta que aparecieron sus hospederos las leguminosas con quienes desarrollaron la relación simbiótica planta-bacteria. Esto sostiene la teoría de que los genes de la nodulación que codifican para las moléculas señales de los rizobios que son la clave para desencadenar el proceso de la formación de los nódulos en sus hospederos las leguminosas, surgieron mucho después de que ocurriera la divergencia de los últimos ancestros de los rizobios.^{33,216} Ambos miembros de la pareja de simbioses han coevolu-

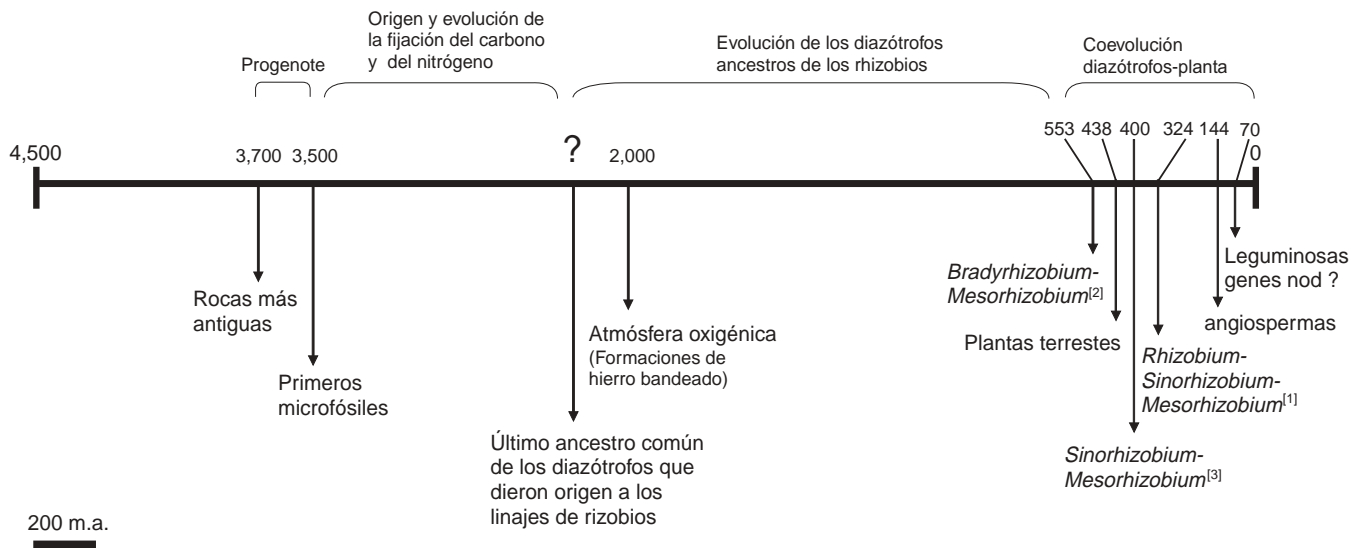


Figura 1. Ubicación del origen y evolución de los rizobios. La separación de los linajes se ubica con base en la secuencia de los genes *glnA* (GSI)[1] y *glnII* (GSI)[2]¹⁷⁷ y en la sustitución de aminoácidos en genes ortólogos[3].¹¹⁴ La barra de escala de tiempo = 200 millones de años.

cionado hace al menos 70 a 100 m.a., desde que las leguminosas se originaron, desarrollando un diálogo de señales que les ha permitido asentar las bases para su relación simbiótica que les confiere la identidad de rizobios. El origen de los genes de la nodulación podría ubicarse después del origen de las leguminosas y en ese momento los diazotóforos últimos ancestros de los distintos linajes de rizobios adquirieron su identidad de diazotóforos que fijan nitrógeno en simbiosis (Fig. 1).

Ubicación de los rizobios dentro de *Proteobacteria*

La comparación de la secuencia de moléculas con funciones conservadas y universales son el testimonio de los cambios que han ocurrido en "el tiempo y modo de la evolución".²⁰² Uno de los primeros genes informativos y el que ha sido más ampliamente utilizado para hacer construcciones filogenéticas es el gen *rrs* que codifica para el RNA ribosomal 16S en procariontes y 18S en eucariontes constituyente de la subunidad pequeña de los ribosomas.^{123,201, 202} Su secuencia nucleotídica presenta una estructura de mosaico en donde existen regiones muy conservadas y otras variables que son útiles para establecer relaciones filogenéticas de amplio rango. Con base en la comparación de las secuencias de *rrs*, Carl Woese propone la agrupación de todos los seres vivos en un árbol filogenético con tres ramas principales bien definidas a las que asignó la categoría de "dominios" como el taxon de más alta jerarquía.²⁰²⁻²⁰⁵ Los procariontes constituyen los dominios de Bacteria y Archaea, y los eucariontes se agrupan en el dominio de Eucarya. Este trabajo pionero de Woese

y colaboradores ha provisto de un marco objetivo para determinar las relaciones evolutivas de procariontes.²⁰² La aplicación de las técnicas moleculares a la sistemática procarionte introdujo la comparación de las secuencias del gen *rrs* como una herramienta de clasificación taxonómica,^{93,95} basada en filogenia molecular que revolucionó su taxonomía. Las secuencias de este gen constituyen una parte importante de bases de datos generales como el Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/), o especializadas como el Ribosomal Data Base Project (www.cme.msu.edu/RDP/) y su porcentaje de similitud ha sido aceptado como línea de corte para la descripción de especies nuevas de procariontes.^{143,163} Dentro del dominio de Bacteria, las divisiones con secuencias pertenecientes a representantes que han sido cultivados con el mayor número de integrantes son *Proteobacteria*, el grupo *Bacteroides-Cytophaga-Flexibacter* y las dos divisiones de bacterias Gram positivas de alto y bajo contenido de G+C.⁷⁰ *Proteobacteria* es hasta ahora la división más grande y diversa dentro del dominio Bacteria^{70,134} y su filogenia a partir de la comparación de la secuencia de *rrs* las agrupa en 5 linajes designados como subdivisiones nombrados por las letras del alfabeto griego α , β , γ , δ , ϵ , siendo en las dos primeras donde se ubican todos los rizobios. La arquitectura general del 16S rRNA está conservada en todos los dominios de la vida y dentro de cada uno, existen regiones características que los definen.^{60,202} Dentro de la división *Proteobacteria*, han sido descritos motivos diagnósticos en la estructura secundaria del 16S rRNA que distinguen a sus subdivisiones.¹²⁵ En la región ubicada entre las posiciones 180 y 220 con respecto a la numeración del gen *rrs* de *Escherichia coli*,

han sido descritos dos motivos diagnósticos para la división Proteobacteria que muestran que a nivel de estructura primaria y secundaria, las subdivisiones β y γ son las más cercanas entre sí. El segundo motivo diagnóstico ubicado entre las posiciones 198 a 219 es un tallo de 8 bases apareadas en todas las subdivisiones de Proteobacteria a excepción de la subdivisión α en la que es más corto, con sólo dos bases apareadas, por lo que puede ser considerado como un carácter diagnóstico para esta subdivisión.²⁰²

Filogenia de rizobios con base en la comparación de las secuencias del gen rrs

La inferencia filogenética basada en la comparación de la secuencia del gen *rrs* ha sido ampliamente utilizada en la taxonomía e identificación de los rizobios.^{105,126,145,198,209,213,217,218} Dentro de la subdivisión α -Proteobacteria el gen *rrs* resuelve la filogenia de los rizobios en siete géneros: *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, siendo los cuatro últimos, los que cuentan con el mayor número de especies descritas. Hasta este momento, han sido descritas 51 especies de rizobios en α - y β -Proteobacteria, 48 y 3 respectivamente (Tabla 1, Fig. 2). Por su importancia agronómica y como modelo de estudio, cuatro especies de α -Proteobacteria tienen una cepa representante con genoma completo secuenciado: *Mesorhizobium huakuii* MAFF303099,⁷⁶ *Agrobacterium tumefaciens* C58,²⁰⁶ *Sinorhizobium meliloti* 1021⁴⁹ y *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110,⁷⁷ y tres más se encuentran en proceso: *R. etli* CFN42 (www.cifn.unam.mx/retlidb/), *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum/) y *Mesorhizobium* sp. BNC1 (www.genome.ornl.gov/microbial/meso_BNC1/). Los grupos más próximos entre sí dentro de los rizobios de α -Proteobacteria son *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. De estos tres géneros, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* son muy cercanos entre sí y menos próximos a *Mesorhizobium*, por lo que se ha sugerido que *Sinorhizobium* pudiera ser considerado como un subclado dentro del género *Rhizobium*,²¹³ sin embargo, mientras mayor es el número de secuencias que se incluyen de cada grupo, la filogenia de las especies de *Sinorhizobium* se resuelve como un grupo monofilético,¹⁷⁴ y la designación taxonómica del género *Sinorhizobium*¹⁸ se mantiene desde la enmienda propuesta por de Lajudie et al. (1994).²⁸ Estos dos clados de rizobios de rápido crecimiento constituyen taxa independientes pero muy cercanos y han sido designados como los dos géneros que forman a la familia Rhizobiaceae.²¹³ En los análisis filogenéticos del gen 16S rRNA,^{174,213} así como en otros genes del genoma básico, las especies de los géneros de *Rhizobium* se entrelazan con las de *Agrobacterium*,^{52,171,213} indicando que ambos géne-

ros no se separan cada uno como linajes monofiléticos y por lo tanto su denominación taxonómica como géneros distintos no corresponde con una clasificación natural, criterio que fue establecido hace más de una década en el reporte del comité *ad hoc* sobre conciliación de criterios en sistemática bacteriana¹⁹⁵ que aún sigue vigente.¹⁶³ La fusión de ambos géneros dentro del género *Rhizobium* plantea que la nomenclatura debe considerar las relaciones filogenéticas del genoma básico y no estar basada en elementos genómicos transmisibles.²¹⁴ La propuesta de re-clasificación de *Agrobacterium* está siendo discutida.^{43,214}

El género *Mesorhizobium* tiene características intermedias entre los rizobios de rápido crecimiento, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, y el de lento crecimiento, *Bradyrhizobium* y constituye un clado independiente junto con el género no simbiote *Phyllobacterium* como su pariente más cercano. El género *Brucella* se agrupa dentro del género *Sinorhizobium* cuando el número de secuencias que se compara es bajo.²⁸ *Bradyrhizobium* es el género de rizobio de lento crecimiento y probablemente el más antiguo, pues como ya se mencionó arriba, es el único rizobio con representantes fotosintetizadores y parientes que no son diazotrofos simbiotes pero que sí fotosintetizan como lo es el género *Rhodopseudomonas*.¹¹² Otro grupo corresponde al género monoespecífico *Azorhizobium*, cuya única especie es *Azorhizobium caulinodans* que, tiene el rango de hospedero más estrecho, solamente nodula a *Sesbania rostrata*.³⁸ Finalmente, dos grupos de bacterias se han sumado dentro de α -Proteobacteria con la descripción de *Devosia neptuniae* sp. nov.,¹³⁹ y *Methylobacterium nodulans* sp. nov.,¹⁶⁹ única bacteria metilótrofa capaz de establecer simbiosis con leguminosas.

El gen *rrs* es un buen marcador molecular para construir filogenias de linajes a nivel de dominio, división y subdivisión, y quizá la resolución pueda llegar a nivel de género en la mayoría de los casos, pero para nivel de especie, puede que no sea suficientemente resolutivo debido al alto grado de conservación que existe dentro de algunas especies como es el caso de los rizobios. La disimilitud de las secuencias de este gen dentro del género *Bradyrhizobium* no es suficiente para ser discriminativa entre especies.¹⁸⁷ Estos ejemplos son fuertes evidencias que cuestionan la validez de la comparación de las secuencias del gen *rrs* para definir a estas especies,^{106,182} en especial *Bradyrhizobium*.¹⁸⁷ Otra desventaja son los eventos de transferencia horizontal debido a que regiones muy conservadas permiten que ocurra recombinación entre linajes distintos que oscurecen la relación de la herencia vertical. Las reiteraciones de este gen son otro inconveniente para utilizarlo en inferencia filogenética debido a que copias del mismo gen pueden no ser idénticas como resultado de los eventos de

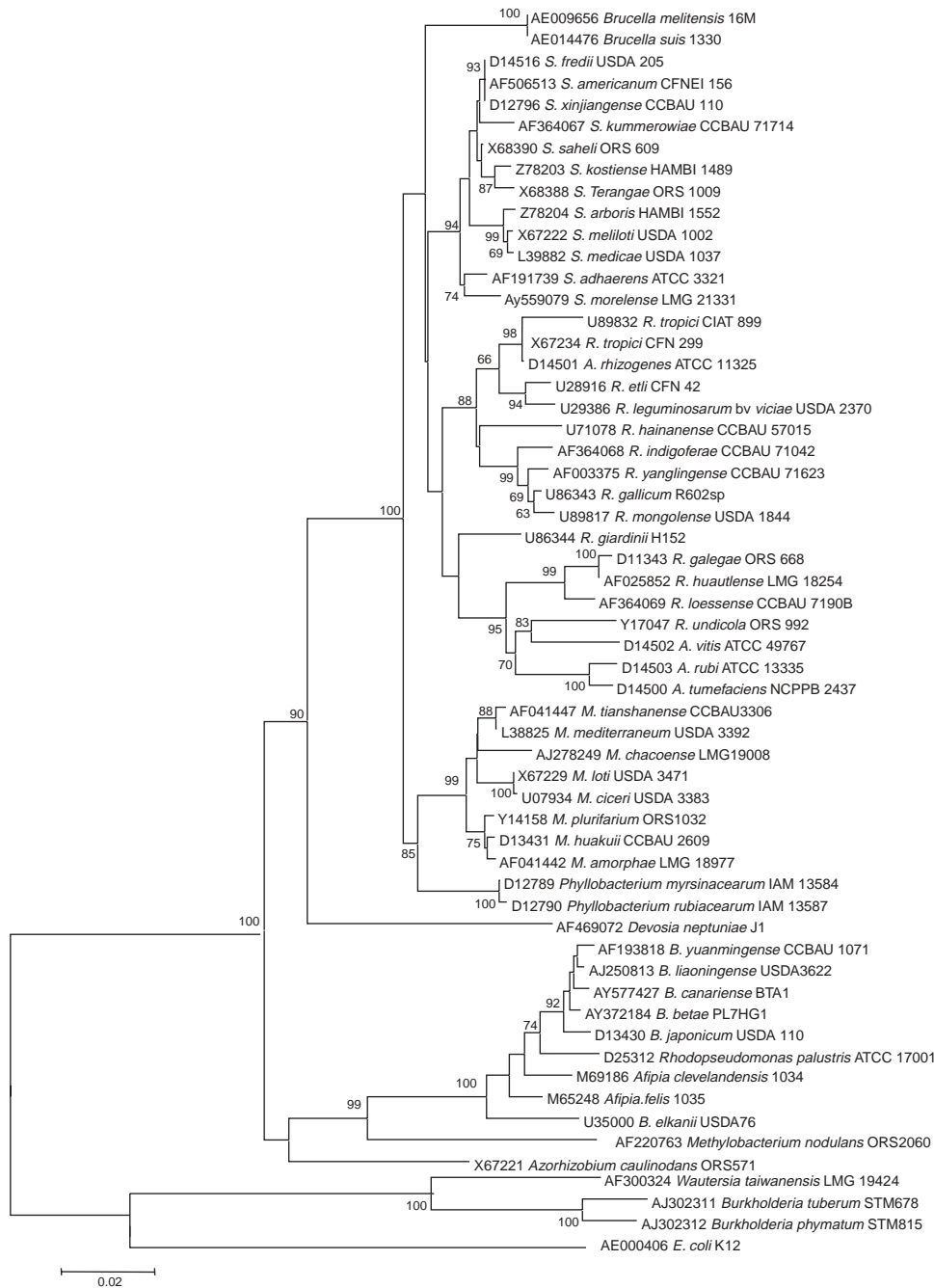


Figura 2. Árbol filogenético del gen *rrs* (16S rRNA). La clave de acceso al GenBank antecede al nombre de la especie de las especies descritas de rizobios y sus parientes más cercanos a partir de un alineamiento de 1,293 bases, de la posición 73 a la 1,330 con respecto al gen *rrs* de *S. melloti* 1021, realizado con el programa Clustal W.¹⁷³ La filogenia fue inferida con el modelo de Tamura-Nei y el método de distancia neighbor-joining¹⁴⁴ mediante el programa Mega2.⁸⁰ Las posiciones con gaps fueron omitidas. Los números en los nodos representan el porcentaje del bootstrapping con 1,000 repeticiones. La barra de escala = 0.02 sustituciones por sitio. A. = *Agrobacterium*, B. = *Bradyrhizobium*, M. = *Mesorhizobium*, R. = *Rhizobium*, S. = *Sinorhizobium*.

transferencia horizontal de genes ortólogos. Los dos operones ribosomales de la arquea *Haloarcula marismortui* difieren en un 5% en el gen *rrs*.¹¹⁶ Otro ejemplo de transferencia horizontal del operón ribosomal fue reportado en el actinomiceto termofílico *Thermomonospora chromogena*. Uno de los cinco operones ribosomales de *T. chromogena*, el operón *rrnB*, tiene mayor identidad con el operón *rrnA* de *Thermobispora bispora* que con sus otros cuatro opero-

nes.²¹² También en rizobios han sido reportados casos de heterogeneidad dentro del gene *rrs*. Se encontraron aislados de diferentes especies, de *R. etli* y *R. leguminosarum*, con alelos iguales en este gen.⁴⁰ En *S. saheli* las secuencias del 16S rRNA son distintas.²¹⁸ Ningún gene con regiones conservadas es inmune a eventos de transferencia horizontal¹²¹ por lo tanto, es recomendable el uso de más marcadores moleculares para poder tener una idea más clara de la afiliación

Tabla 1. Especies descritas de rizobios y lugar de procedencia de la leguminosa hospedera.

Género	Cepa tipo	Hospedero de aislamiento	Lugar de aislamiento	Referencia/Fuente	
<i>α-Proteobacteria</i>					
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i> ORS571 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal, África	38	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. betae</i> PL7HG1 ^T	<i>Beta vulgaris</i> *	España	140	
	<i>B. canariense</i> BTA-1 ^T	<i>Chamaecytisus proliferus</i>	Tenerife, Islas Canarias	187	
	<i>B. elkanii</i> USDA76 ^T	<i>Glycine max</i>	Maryland, U.S.A.	81	
	<i>B. japonicum</i> USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	Japón	81	
	<i>B. liaoningense</i> USDA3622 ^T	<i>Glycine max</i>	Heilongjiang, China	208	
	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 1071 ^T	<i>Lespedeza cuneata</i>	Yuanmingyuan, Pekin, China	211	
	<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i> J1 ^T	<i>Neptunia natans</i>	India	139
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i> ORS2060 ^T	<i>Crotalaria pocarpa</i>	Senegal, África	169	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i> LMG 18977 ^T	<i>Amorpha fruticosa</i>	China	191	
	<i>M. chacoense</i> PR5 ^T	<i>Prosopis alba</i>	Chancaní, Argentina	186	
	<i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	España	73, 119	
	<i>M. huakuii</i> CCBAU 2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Nanjing, China	19, 73	
	<i>M. loti</i> USDA 3471 ^T	<i>Lotus tenuis</i>	Nueva Zelanda	72, 73	
	<i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	España	73, 120	
	<i>M. plurifarium</i> ORS1032 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal, África	29	
	<i>M. septentrionale</i> SDW014 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Norte de China	51	
	<i>M. temperatum</i> SDW018 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Norte de China	51	
	<i>M. tianshanense</i> CCBAU3306 ^T	<i>Glyzyrrhiza pallidiflora</i>	Xinjiang, China	20, 73	
	<i>Rhizobium y Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i> NCPPB2437 ^T			25,158, 213
		<i>A. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T			25, 137, 213
		<i>A. rubi</i> ATCC 13335 ^T			66, 164, 213
		<i>A. vitis</i> ATCC 49767 ^T			124, 213
<i>R. etli</i> CFN 42 ^T		<i>Phaseolus vulgaris</i> ,	Guanajuato, México	150	
<i>R. galegae</i> HAMBI 540 ^T		<i>Galega orientalis</i>	Finlandia	90	
<i>R. gallicum</i> R602sp ^T		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Maine et Loire, Francia	4	
<i>R. giardinii</i> H152 ^T		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Côte d'Or, Francia	4	
<i>R. hainanense</i> CCBAU 57015 ^T		<i>Desmodium sinuatum</i>	Hainan, China	21	
<i>R. huautlense</i> LMG 18254 ^T		<i>Sesbania herbacea</i>	Sierra de Huautla, Morelos, México	189	
<i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T	<i>Indigofera</i> spp.	Meseta de Loess, noroeste de China	196		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	<i>Vicia faba</i>		46, 47, 72		
<i>R. loessense</i> CCBAU 7190B ^T	<i>Astragalus complanatus</i>	Meseta de Loess, China	197		
<i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T	<i>Medicago ruthenica</i>	Mongolia	180		
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia	103		
<i>R. undicola</i> ORS 992 ^T	<i>Neptunia natans</i>	Senegal, África	30, 213		
<i>R. yanglingense</i> CCBAU 71623 ^T	<i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	Gansu, Noroeste de China	170		
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. adhaerens</i> ATCC 33212 ^T		Pensilvania, E.U.A.	17, 200	
	<i>S. americanum</i> CFNEI156 ^T	<i>Acacia acatensis</i>	Sierra de Huautla, Morelos, México	174	
	<i>S. arboris</i> HAMBI 1552 ^T	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudán, África	117	
	<i>S. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>Glycine soja</i>	Honan, China	18, 147	
	<i>S. kostiense</i> HAMBI 1489 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Sudán, África	117	
	<i>S. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Meseta de Loess, China	196	
	<i>S. medicae</i> USDA 1037 ^T	<i>Medicago truncatula</i>	Francia	142	
	<i>S. meliloti</i> USDA1002 ^T	<i>Medicago sativa</i>		75	
	<i>S. morelense</i> LMG 21331 ^T	<i>Leucaena leucocephala</i>	Sierra de Huautla, Morelos, México	194	
	<i>S. sahelii</i> ORS 609 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal, África	28	
	<i>S. terangaie</i> ORS 1009 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal, África	28	
	<i>S. xinjiangense</i> CCBAU110 ^T	<i>Glycine max</i>	Xinjiang, China	18	
	<i>β-Proteobacteria</i>				
<i>Wautersia</i>	<i>W. taiwanensis</i> LMG 19424 ^T	<i>Mimosa pudica</i>	Taiwan, China	22, 184	
<i>Burkholderia</i>	<i>B. tuberum</i> STM 678 ^T	<i>Aspalathus carnosa</i>	Sudáfrica	183	
	<i>B. phymatum</i> STM815 ^T	<i>Machaerium lunatum</i>	Guayana Francesa	183	

* familia Amaranthaceae

de los miembros de una especie.

Inferencias filogenéticas a partir de otros genes cromosomales: rrl, atpD, recA, glnA y glnII.

A finales de los años noventa, otros genes con funciones conservadas comenzaron a ser utilizados para comparar y refinar la filogenias construidas con el gen *rrs* y muchos de ellos han sido empleados para el estudio de la inferencia filogenética de rizobios de α -Proteobacteria, entre los que se encuentran: el gen *rrl* que codifica para el 23S rRNA,^{127,171,172,181} los genes *glnA* y *glnII*¹⁷⁷ que codifican para las enzimas glutamino sintetasa GSI y GSII respectivamente, *atpD* que codifica para la subunidad β de la ATP sintetasa,^{52,94} *recA*^{41,52} que codifica para la proteína esencial del sistema de recombinación homóloga en bacteria, *dnaK*¹⁶⁵ que codifica para una proteína chaperona involucrada en varios procesos celulares que incluyen la asistencia en el plegamiento de polipéptidos nacientes y el ensamblaje de complejos de proteínas, y el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa.^{78,111} El agrupamiento filogenético de los rizobios con estos genes cromosomales coincide con la filogenia inferida a partir del gen *rrs* en la topología de los principales clados como géneros independientes y las diferencias ocurren a nivel intragenérico. La filogenia de *rrs* agrupa a las especies de *Mesorhizobium* como un clado fuera del grupo de rizobios de rápido crecimiento (*Rhizobium*-*Sinorhizobium*) y las inferencias con *recA*, *atpD*⁵² y *glnA*¹⁷⁷ coinciden con esta agrupación, pero la relación entre las especies no es la misma en todos los casos. La agrupación con el gen *glnII* separa a *M. huakuii* del género *Mesorhizobium* y lo agrupa más cercanamente a *Rhizobium*, sugiriendo la transferencia horizontal de este gen.¹⁷⁷ Los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, al igual que lo que ocurre con el 16S rRNA, en las filogenias con los genes *recA* y *atpD*, no forman clados separados, las especies de ambos géneros se encuentran entrelazadas y más distantes del género *Sinorhizobium*, lo cual justifica la propuesta de que ambos géneros se fusionen en uno solo.²¹³ El agrupamiento de *A. rhizogenes* con *R. tropici*, y de *R. etli* con *R. leguminosarum* también se conserva. *R. galegae* se agrupa como grupo hermano con *A. tumefaciens* pero cuando se incluyen más especies de *Rhizobium* esta relación no se conserva.^{174,189}

La inferencia filogenética a partir de la comparación de las secuencias del gen *rrl* ha sido significativamente menos utilizada que la del *rrs* debido a su mayor tamaño y por esta razón existen varios casos de comparaciones de secuencias parciales en distintos lugares del gen. Las topologías varían de acuerdo al número de secuencias incluidas y al fragmento representado. A diferencia de lo que su-

cede con otros genes cromosomales, la inferencia filogenética con la secuencia casi completa de 23S rRNA de cepas de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*, no resuelve al género *Sinorhizobium* como un clado independiente.¹²⁷ Comparando 879 nucleótidos del gen *rrl* (de la posición 1,086 a la 1,964 con respecto al gen *rrl* de *E. coli*), *R. leguminosarum* y *R. etli* se ubican más cerca de *Sinorhizobium meliloti* que de *Agrobacterium* a diferencia de *rrs*, *recA*, *atpD* y las GS.¹⁷² Con secuencias parciales, *R. mongolense* se agrupa dentro del clado de *Sinorhizobium* como grupo hermano de *S. saheli*.¹⁸¹ La posición de *R. galegae* por PCR-RFLPs también es variable, se agrupa cerca de *Agrobacterium vitis* por secuencias del 16S rRNA y cerca de *Sinorhizobium meliloti* por el 23S.¹⁷¹ Las construcciones filogenéticas con otros marcadores cromosomales como *recA* y *atpD*⁵² revelan que las relaciones filogenéticas del grupo son más parecidas al 16S que al 23S y quizá esto sea debido a que la tasa de variación del 23S sea mayor a la del 16S, o bien, que por ser una secuencia más larga, existe un mayor número de sitios en donde potencialmente puedan ocurrir eventos de recombinación homóloga que hayan integrado fragmentos ajenos que reflejan incongruencia filogenética entre ambos genes ribosomales.^{53,116, 212}

Incongruencias filogenéticas de los genes simbióticos y los genes del genoma básico

Los genes simbióticos forman parte del paquete genético flexible⁹ por estar codificados en plásmidos que pueden ser ganados o perdidos y por esta razón, no necesariamente reflejan las relaciones filogenéticas del genoma básico de la bacteria, sino más bien la relación con su hospedero. Entre los genes simbióticos que han sido utilizados para hacer construcciones filogenéticas, se encuentran el gen *nifH*^{39,64,86,179} que codifica para la enzima nitrogenasa reductasa responsable de la fijación biológica del nitrógeno y que tiene reiteraciones en algunas especies,^{45,100,133} los genes del operón *nodABC*^{8,64,86,197} de los que no hay reiteraciones y codifican para las enzimas responsables de la construcción de la estructura básica de los factores Nod, y *nodD*⁹¹ también reiterado en varias especies y que codifica para proteínas activadoras de la transcripción de algunos genes. Las filogenias construidas con los genes simbióticos son incongruentes con las filogenias del 16S rRNA. En las filogenias de los genes *nod* se pueden ver agrupadas dentro del mismo clado a especies que por criterio del 16S rRNA pertenecen a especies, e incluso géneros distintos, en cambio, las filogenias de los genes simbióticos pueden correlacionar entre sí como ocurre con *nodABC* y *nodD* para ubicar la afiliación filogenética de *Rhizobium galegae*.⁹¹ Los genes *nod* han evolucionado en función de la especie de le-

guminosa a la que nodulan para alcanzar una nodulación óptima^{13,33,215} y su filogenia puede correlacionar con el rango de hospedero de la planta como se ha reportado para *nodB*¹⁹⁷ y *nodC*.^{86,179,197} Las filogenias del gen *nodA* de especies distintas por criterio del 16S rRNA, se agrupan en función del hospedero del que fueron aisladas en *Sinorhizobium terangaie* y *S. saheli* que nodulan tanto a *Sesbania* como a *Acacia*. En la filogenia del gen *nodA*, ambas especies de *Sinorhizobium* se agrupan juntas de acuerdo a la biovariedad de la que fueron aisladas, es decir, *S. terangaie* bv. *acaciae* se agrupa con *S. saheli* bv. *acaciae* y *S. terangaie* bv. *sesbaniae* se agrupa junto con *S. saheli* bv. *sesbaniae*. Además, el clado *Sinorhizobium* de la biovariedad *acaciae* se encuentra más cerca del género *Bradyrhizobium* que de las especies de su propio género de la biovariedad *sesbaniae*.⁸ Haukka y colaboradores⁶⁴ estudiaron la variación alélica de dos *loci* simbióticos que representan los dos aspectos que implica la simbiosis bacteria-planta, la fijación de nitrógeno (*nifH*) y la nodulación (*nodA*) en cepas de *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* aislados de *Prosopis* y *Acacia* principalmente, procedentes de África y Latinoamérica, de manera que añaden el componente biogeográfico a la relación entre los genes simbióticos y el rango de hospedero. Las filogenias de ambos genes muestran tres brazos principales: sinorhizobia africanos, sinorhizobia latinoamericanos y mesorhizobia que se entremezclan en ambas regiones. En el género *Sinorhizobium*, los aislados de *Prosopis* y *Acacia* muestran congruencia entre los dos *loci* simbióticos en aislados de México y Brasil, sin embargo, muestran diferencias con la filogenia de aislados africanos lo cual sostiene la idea de que los genes simbióticos de *Sinorhizobium* han coevolucionado con estos hospederos tropicales que se encuentran en dos continentes distintos.¹⁷⁴ En *Mesorhizobium* la filogenia de los genes simbióticos va más en función del hospedero que de la zona biogeográfica.¹⁹⁷

Considerando las incongruencias filogenéticas reportadas entre los genes que constituyen parte del genoma básico (*rrs*, *atpD*, *recA*, *glnA* y *glnII*) y los genes simbióticos que forman parte del paquete genético flexible (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD* y *nifH*), así como la existencia de fondos genéticos no simbióticos y no patógenos que se pueden convertir en simbioses o patógenos adquiriendo los plásmidos simbióticos e islas de simbiosis, o los plásmidos Ti o Ri respectivamente, la reconstrucción de la filogenia de los rizobios debe de considerar tres criterios que incluyan:¹⁹³ 1. Genes cromosomales comunes del genoma básico para ubicar su posición filogenética; 2. Genes involucrados con la fijación de nitrógeno para poder establecer relaciones con otras bacterias fijadoras de nitrógeno ya que es una característica ancestral de amplio espectro filogenético; 3. Genes de la nodulación que son buenos marcadores de la coevolución de los rizobios con su hospedero, así como de su origen biogeográfico.

AGRADECIMIENTOS

A Ernesto Ormeño y Julio Martínez-Romero por la revisión y valiosos comentarios en la preparación de este manuscrito. A Mary Tavera, Edith Cinta y Shirley Ainsworth por su indispensable y excelente apoyo bibliotecario.

REFERENCIAS

- Ahern, C.P. & I.A. Staff. 1994. Symbiosis in cycads: The origin and development of coralloid roots in *Macrozamia communis* (Cycadaceae). *Am. J. Bot.* 81:1559-1570.
- Alazard, D. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:732-734.
- Allen, O.N. & E.K. Allen. 1981. The Leguminosae: A source Book of Characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, USA. 800 pages.
- Amarger, N., V. Macheret & G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallium* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:996-1006.
- Awramik, S.M., J.W. Schopf & M.R. Walter. 1983. Filamentous fossil bacteria 3.5 x 10⁹ years old from the Archaean Western Australia. *Precambrian. Res.* 20:357-374.
- Barny, M.A. & J.A. Downie. 1993. Identification of the NodC protein in the inner but not the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8:669-672.
- Benson, D.R., D.W. Stephens, M.L. Clawson & W.B. Silvester. 1996. Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2904-2909.
- Boivin, C. & E. Giraud. 1999. Molecular symbiotic characterization of rhizobia, pp. 295-299. Martínez, E. & G. Hernández (Eds). *Highlights of Nitrogen Fixation Research*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Boucher, Y., C.L. Nesbo & W.F. Doolittle. 2001. Microbial genomes: dealing with diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:285-289.
- Broda E. & G.A. Peschek. 1980. Evolutionary considerations on the thermodynamics of nitrogen fixation. *Biosystems* 13:47-56.
- Brom, S., A. García de los Santos, L. Cervantes, R. Palacios & D. Romero. 2000. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *J. Bacteriol.* 144:34-43.
- Broughton, W.J. & J.C. John. 1979. Rhizobia in tropical legumes. III. Experimentation and supply in Malaysia 1927-1976. pp. 113-136. In: Broughton, W.J., John, C.K., Rajaro, J.C. & Lim, B. (ed.), *Soil Microbiology and Plant nutrition*. University of Malasya Press, Kuala Lumpur.
- Broughton, W.J. & X. Perret. 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Curr. Op. Plant Biol.* 2:305-311.
- Broughton, W.J., S. Jabboury & X. Perret. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182:5641-5652.
- Burke D.H., J.E. Hearst & A. Sidow. 1993. Early evolution of photosynthesis: clues from nitrogenase and chlorophyll iron proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7134-7138.
- Burn, J., L. Rossen & A.W.B. Johnston. 1987. Four classes of mutations in the *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* that affect its ability to autoregulate and/or activate other *nod* genes in the presence of flavonoid inducers. *Genes Dev.* 1:456-464.
- Casida, L.E. Jr. 1982. *Ensifer adherens* gen nov. sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:339-345.

18. Chen, W.X., G.H. Yan & L.J. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:392-397.
19. Chen, W.X., G.S. Li, Y. Qi, E.T. Wang, H.L. Ruan & J.L. Li. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov., isolated from the root nodules of *As-tragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:275-280.
20. Chen, W.X., E. Wang, S. Wang, Y. Li, X. Chen & Y. Li. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 153-159.
21. Chen, W.-X., Z.-Y. Tan, J.-L. Gao, Y. Li & E.-T. Wang. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:870-873.
22. Chen, W.-M., S. Laevens, T.-M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay & P. Vandamme. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1729-1735.
23. Chen, W.X., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Béna & C. Boivin-Masson. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. J. Bacteriol. 185:7266-7272.
24. Cloud, P.E. Jr. 1974. The evolution of ecosystems. Am. Scientist 62:54-66.
25. Conn, H.J. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. J. Bacteriol. 44:353-360.
26. Corvera, A., D. Prome, J.C. Prome, E. Martínez-Romero & D. Romero. 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. Mol. Plant Microbe Interact. 12:236-246.
27. Debelle, F., L. Moulin, B. Mangin, J. Denarie & C. Boivin. 2001. *nod* genes and *Nod* signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. Acta Biochim. Pol. 48:359-65.
28. de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M.D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters & M. Gillis. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* and *Sinorhizobium terangae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:715-733.
29. de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M.D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus & M. Gillis. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:369-382.
30. de Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kersters, B. Dreyfus & M. Gillis. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:1277-1290.
31. Dénarié, J., F. Debelle & C. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 46:497-531.
32. Dénarié, J. & J. Cullimore. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell 74:951-954.
33. Dobert, R.C., B.T. Briel & E.W. Triplett. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. Mol. Plant Microbe Interact. 7:564-572.
34. Downie, J.A. 1998. Functions of Rhizobial Nodulation genes, pp.387-399. In Spaink, H.P., Kondoroski, A. & Hooykaas, P.J.J. (Eds). The Rhizobiaceae, Kluwer Academic Publishers.
35. Doyle, J.J., J.L. Doyle, J.A. Ballenger, E.E. Dickson, T. Katija, and H. Oashi. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: Taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. Am. J. Bot. 84:541-554.
36. Doyle, J.J. 1998. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends Plant Sci. 3:473-478.
37. Dreyfus, B.L. & Y. Dommergues. 1981. Nodulation of *Acacia* species by fast and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. 41:97-99.
38. Dreyfus, B., J.L. García & M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.
39. Eardly, B.D., J.P.W. Young & R.K. Selander. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. Appl. Environ. Microbiol. 58:1809-1815.
40. Eardly, B.D., F.S. Wang, T.S. Whittam & R.K. Selander. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Appl. Environ. Microbiol. 61:507-512.
41. Eisen, J.A. 1995. The *recA* protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. J. Mol. Evol. 41:1105-1123.
42. Eisen J.A., K.E. Nelson, I.T. Paulsen, J.F. Heidelberg, M. Wu, R.J. Dodson, R. Deboy, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.H. Haft, E.K. Hickey, J.D. Peterson, A.S. Durkin, J.L. Kolonay, F. Yang, I. Holt, L.A. Umayam, T. Mason, M. Brenner, T.P. Shea, D. Parksey, W.C. Nierman, T.V. Feldblyum, C.L. Hansen, M.B. Craven, D. Radune, J. Vamathevan, H. Khouri, O. White, T.M. Gruber, K.A. Ketchum, J.C. Venter, H. Tettelin, D.A. Bryant & C.M. Fraser. 2002. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:9509-9514.
43. Farrand, S.K., P. van Berkum & P. Oger. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1681-1687.
44. Fischer, H.M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol. Rev. 58:352-386.
45. Flores, M., V. González, S. Brom, E. Martínez-Romero, D. Piñero, D. Romero, G. Dávila & R. Palacios. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* ssp. J. Bacteriol. 12:5782-5788.
46. Frank, B. 1879. Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwillungen der Papilionaceen. Bot. Ztg. 37:376-387, 394-399.
47. Frank, B. 1889. Ueber die pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 7:332-346.
48. Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W.J. Broughton, A. Rosenthal & X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387:394-401.
49. Galibert F., T.M. Finan, S.R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M.J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R.W. Davis, S. Dreano, N.A. Federspiel, R.F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Guzy, M. Gurjal, I. Hernández-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R.W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M.L. Kahn, S. Kalman, D.H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M.C. Peck, T.M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F.J. Vorholter, S. Weidner, D.H. Wells, K. Wong, K.C. Yeh & J. Batut. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293:668-672.
50. Ganesh, G., A.K. Misra, C. Chapelon & P. Normand. 1994. Morphological and molecular characterization of *Frankia* sp. isolates from nodules of *Alnus nepalensis*. Arch. Microbiol. 161:152-155.

51. Gao, J.L., S.L. Turner, F.L. Kan, E.T. Wang, Z.Y. Tan, Y.H. Qiu, Z. Terefework, J.P.W. Young, K. Lindstrom & W.X. Chen. 2004. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2003-2012.
52. Gaunt, M.W., S.L. Turner, L. Rigottier-Gois, S.A. Lloyd-Macgilp & J.P.W. Young. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2037-2048.
53. Gogarten, J.P., F. Doolittle & J.G. Lawrence. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19:2226-2238.
54. Goremykin, V.V., S. Hansman & W.F. Martin. 1997. Evolutionary analysis of 58 proteins encoded in six completely sequenced chloroplast genomes: revised molecular estimates of two seed plant divergence times. *Plant Syst. Evol.* 206:337-351.
55. Gottfert, M., S. Rothlisberger, C. Kundig, C. Beck, R. Marty & H. Hennecke. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* 183:1405-1412.
56. Gray C.T. & H. Gest. 1965. Biological formation of molecular hydrogen. *Science* 148:186-192.
57. Groisman, A.G. & H. Ocham. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87:791-794.
58. Gualtier, G. & T. Bisseling. 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* 42:181-194.
59. Guo, X.W., X.X. Zhang, Z.M. Zhang & F.D. Li. 1999. Characterization of *Astragalus sinicus* rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and nodulation gene regions. *Curr. Microbiol.* 39:358-364.
60. Gutell, R.R., B. Weiser, C.R. Woese & H.F. Noller. 1985. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32:155-216.
61. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer & H. Tschäpe. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function, and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23:1089-1097.
62. Hacker, J. & E. Carniel. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO Rep.* 21:376-381.
63. Harrier, L.A., P.W. Whytty, J.M. Sutherland & J.I. Sprent. 1997. Phenetic investigation of non-nodulating African species of *Acacia* (Leguminosae) using morphological and molecular markers. *Plant Syst. Evol.* 205:27-51.
64. Haukka, K., K. Lindström & P.J.W. Young. 1998. The phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:419-426.
65. Hernández-Lucas, I., L. Segovia, E. Martínez-Romero & S. Puepcke. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2775-2779.
66. Hildebrand, E.M. 1940. Cane gall of brambles caused by *Phytomonas rubi* n. sp. *J. Agric. Res.* 61:685-696.
67. Hiltner, L. & K. Störmer. 1903. Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger. Arbeiten aus der Biologischen Abteilung für Land- und Forstwirtschaft, Kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin 3:151-307.
68. Honma, M. A., M. Asomaning & F. M. Ausubel. 1990. *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. *J. Bacteriol.* 172:901-911.
69. Horvarth, B., C.W. Bachem, J. Schell & A. Kondoros. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* 6:841-848.
70. Hugenholtz, P., B.M. Goebel & N.R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765-4774.
71. Iwabe, N., K.-L. Kuma, M. Hasegawa, S. Osawa & T. Miyata. 1989. Evolutionary relationships of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9355-9359.
72. Jarvis, B.D.W., C. Pankhurst & J.J. Patel. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:378-380.
73. Jarvis, B.D.W., P. van Berkum, W.X. Chen, S.M. Nour, M.P. Fernández, J.C. Cleyet-Marel & M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:895-898.
74. Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:136-139.
75. Jordan, D.C. 1984. Rhizobiaceae, pp. 234-254. In N.R. Kreig & J.G. Holt (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1 The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
76. Kaneko T, Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. M. Kiyokawa, Kohara, M.A. Matsumoto, Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpō, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada & S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7:331-338.
77. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiyama, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpō, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada & S. Tabata. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9:189-197.
78. Khamis, A., P. Colson, D. Raoult & B. La Scola. 2003. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afpia* and *Bosea* Species, Including a Strategy for Choosing Discriminative Partial Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6740-6749.
79. Knowlton, S., A. Berry, J.G. Torrey. 1980. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by Frankia. *Can. J. Microbiol.* 26:971-977.
80. Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen & M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244-1245.
81. Kuykendall, L.D., B. Saxena, T.E. Devine & S.E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38:501-505.
82. La Berge, G.L. 1967. Microfossils and Precambrian iron formations. *Geol. Soc. Am. Bull.* 78:331-342.
83. Laeremans, T., C. Snoeck, J. Marien, C. Verreth, E. Martínez-Romero, J.C. Prome & J. Vanderleyden. 1999. *Phaseolus vulgaris* recognizes *Azorhizobium caulinodans* Nod factors with a variety of chemical substituents. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:820-4.
84. Lafay, B. & J.J. Burdon. 1998. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in Southeastern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3989-3997.
85. Laguerre, G., P. Mavingui, M.R. Allard, M.P. Charnay, P. Louvrier, S.I. Mazurier, L. Rigottier-Gois & N. Amarger. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and DNA-restriction length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium le-*

- guminosarum* and its different biovars. Appl. Environ. Microbiol. 62:2029-2036.
86. Laguerre, G., S.M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin & N. Amarger. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiol. 147:981-93.
 87. Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J.-C. Promé & J. Denarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344:781-784.
 88. Lewin, A., C. Rosenberg, H. Meyer, C.-H. Wong, L. Nelson, J.-F. Manen, J. Stanley, D. N. Dowling, J. Dénarié & W. J. Broughton. 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. Plant Mol. Biol. 8:447-459.
 89. Lilburn, T.G., K.S. Kim, N.E. Ostrom, K.R. Byzek, J.R. Leadbetter & J.A. Breznak. 2001. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. Science 292:2495-2498.
 90. Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 365-367.
 91. Lindström, K., K. Paulin, L. Ross & L. Souminen. 1995. Nodulation genes of *Rhizobium galegae*. In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and applications. Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation, pp 365-370. (Eds). by Tikhonovitch, I.A., N.A. Provorov, V.I. Romanov & W.E. Nexton. Dor drecht: Kluwer.
 92. Lortet, G., N. Méar, J. Lorquin, B. Dreyfus, P. de Lajudie & C. Boivin. 1996. Nod Factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium teranga*, and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. Mol. Plant Microbe Interact. 9:736-747.
 93. Ludwig, W. & K.H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. 15:155-173.
 94. Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner & K.H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis 19:554-568.
 95. Ludwig, W., O. Strunk & K.H. Schleifer. 1999. rRNA Based Phylogeny and Identification: The Impacts on Bacterial Taxonomy, 263-266. In Martínez, E. & G. Hernández (Eds). Highlights of Nitrogen Fixation Research., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
 96. Margulis, L. 1993. Symbiosis in cell evolution. H.W. Freeman and Company. 2^o ed. 118-130.
 97. Marie, C., M.A. Barny & J.A. Downie. 1992. *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthases, GlmS and NodM, required for nodulation and development of nitrogen-fixing nodules. Mol. Microbiol. 6:843-851.
 98. Martin, W., A. Gierl & H. Seadler. 1989. Molecular evidence for pre-Cretaceous angiosperm origins. Nature 339:46-48.
 99. Martin, W., D. Lydiate, H. Brinkmann, G. Forkmann, H. Seadler & R. Cereff. 1993. Molecular phylogenies in angiosperm evolution. Mol. Biol. Evol. 10:140-162.
 100. Martínez-Romero, E., M.A. Pardo, R. Palacios & M.A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. J. Gen. Microbiol. 131:1779-1786.
 101. Martínez, E., R. Palacios & F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. J. Bacteriol. 169:2828-2834.
 102. Martínez-Romero, E., D. Romero & R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. Crit. Rev. Plant Sci. 9:59-93.
 103. Martínez-Romero, E., L. Segovia, F.M. Mercante, A.A. Franco, P. Graham & M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:417-426.
 104. Martínez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. Plant Soil. 161:11-20.
 105. Martínez-Romero, E. & J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci. 15:113-140.
 106. Martínez-Romero, E., E.T. Wang, A. López Merino, J. Caballero-Mellado, M.A. Rogel, B. Gándara, I. Toledo & J. Martínez-Romero. 1999. Ribosomal gene based phylogenies on trial: the case of *Rhizobium* and related genera, pp.59-63. In de Wit P.J.G.M., T. Bisseling & J. Stiekema (Eds). Biology of plant microbe interactions vol. 2.
 107. Martínez-Romero, E. & D. Phillips. 2000. Biological Nitrogen Fixation. In: Enciclopedia of Microbiology. 2^o ed. Academic Press. Vol.1 pp 492- 505.
 108. Mehta, M.P., D.A. Butterfield & J.A. Baross. 2003. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. Appl. Environ. Microbiol. 69:960-970.
 109. Michiels, J., B. Dombrecht, N. Vermeiren, C.W. Xi, E. Luyten & J. Vanderleyden. 1998. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. FEMS Microbiol. Ecol. 26:193-205.
 110. Minamisawa, K., T. Isawa, Y. Nakatsuka & N. Ichikawa. 1998. New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS alpha. Appl. Environ. Microbiol. 64:1845-1851.
 111. Mollet, C., M. Drancourt & D. Raoult. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol. Microbiol. 26:1005-1011.
 112. Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. De Lajudie & C. Masson-Boivin. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. Appl. Environ. Microbiol. 65:3084-3094.
 113. Moreira, F.M.S., K. Haukka & J.P.W. Young. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. Mol. Ecol. 7:889-895.
 114. Morton, R.A. 2002. Comparison of chromosomal genes from *M. loti* and *S. meliloti* suggest an ancestral genome. In: Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Tulrough M.F., M.R. O'Brian, D.B. Layzell, J.K. Vessey & W. Newton, eds. CBAI Publishing. pp 55-58.
 115. Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. Nature 411:948-950.
 116. Mylvaganam, S. & P. Dennis. 1992. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. Genetics 130:399-410.
 117. Nick, G., P. de Lajudie, B.D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis & K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1359-1368.
 118. Noda, S., M. Ohkuma, R. Usami, K. Horikoshi & T. Kudo. 1999. Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. Appl. Environ. Microbiol. 65:4935-42.
 119. Nour, S.M., M.P. Fernández, P. Normand & J.C. Cleyet-Marel. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol. 44:511-522.

120. Nour, S.M., J.-C. Cleyet-Marel, P. Normand & M.P. Fernández. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:640-648.
121. Ochman, H. & N. Moran. 2001. Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292:1096-1098.
122. Ohkuma, M., S. Noda & T. Kudo. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4926-34.
123. Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannone, N. Pace & D.A. Stahl. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:337-365.
124. Ophel, K. & A. Kerr. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium biovar 3* from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:236-241.
125. Oyaizu, H. & C.R. Woese. 1985. Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:257-263.
126. Oyaizu, H., S. Matsumoto, K. Minamisawa & T. Gamou. 1993. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39:339-354.
127. Palawska, J., M. Maes, A. Willems & P. Sobiczewski. 2000. Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:238-244.
128. Parker, C.A. & P.B. Scutt. 1960. The effect of oxygen on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochim. Biophys. Acta* 38:230-238.
129. Perret, X., C. Staehelin & W.J. Broughton. 2000. Molecular basis for symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180-201.
130. Pesole, G., C. Gissi, C. Lanave & C. Saccone. 1995. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 12:189-197.
131. Provarov, N.A. 1994. The interdependence between taxonomy of legumes and the specificity of their interaction with rhizobia in relation to evolution or the symbiosis. *Symbiosis* 7:183-200.
132. Pueppke, S.G. & W.J. Broughton. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:293-318.
133. Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernández, T. Ballado, G. Soberón & R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-726.
134. Rappé, M.S. & S. J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.
135. Raymond, J., J.L. Siefert, C.R. Staples & R.E. Blankenship. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21:541-554.
136. Relic, B., F. Talmont, J. Kopcinska, W. Golinowsky, J.C. Promé & W.J. Broughton. 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:764-774.
137. Riker, A.J., W.M. Banfield, W.H. Wright, G.W. Keitt & H.E. Sagen. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery trees of apples. *J. Agric. Res.* 41:507-540.
138. Ritsema, T.A., A.H.M. Wijffjes, B.J.J. Lugtenberg & H.P. Spaink. 1996. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factors biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 251:44-51.
139. Rivas, R., A. Willems, N.S. Subba-Rao, P.F. Mateos, F.B. Dazzo, R.M. Kroppenstedt, E. Martínez-Molina, M. Gillis & E. Velázquez. 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:47-53.
140. Rivas, R., A. Willems, J.L. Palomo, P. García-Benavides, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, M. Gillis & E. Velázquez. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1271-1275.
141. Rogel, M.A., I. Hernández-Lucas, L.D. Kuykendall, D.L. Balkwill & E. Martínez-Romero. 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3264-3268.
142. Rome, S., M.P. Fernández, B. Brunel, P. Normand & J.C. Cleyet-Marel. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:972-980.
143. Roselló-Mora, R. & R. Amann. 2000. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:39-67.
144. Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
145. Sawada, H., L.D. Kuykendall & J.M. Young. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49:155-179.
146. Schidlowsky, M.P., P.W.U. Appel, R. Eichmann & C.E. Junge. 1979. Carbon isotope geochemistry of the 3.7×10^9 -yr-old Isua sediments, West Greenland: Implications for the Archean carbon and oxygen cycles. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43:189-199.
147. Scholla, M.H. & G.H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:484-486.
148. Schopf, J.W., E.S. Barghoorn, M.D. Maser & R.O. Gordon. 1965. Electron microscopy of fossil bacteria two billion years old. *Science* 149:1365-1367.
149. Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios & E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426-433.
150. Segovia, L., J.P.W. Young & E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
151. Sessitsch, A., J.G. Howieson, X. Perret, H. Antoun & E. Martínez-Romero. 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21:323-378.
152. Sibold, L., M. Henriquet, O. Possot & J.P. Aubert. 1991. Nucleotide sequence of *nifH* regions from *Methanobacterium ivanovii* and *Methanosarcina barkeri* 227 and characterization of *glnB*-like genes. *Res. Microbiol.* 142:5-12.
153. Silver, W.S. & J.R. Postgate. 1973. Evolution of asymbiotic nitrogen fixation. *J. Theor. Biol.* 40:1-10.
154. Simonet, P., P. Normand, A. Moiroud & R. Bardin. 1990. Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 153:235-240.
155. Soberón-Chávez, G. & R. Nájera. 1989. Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information. *Can. J. Microbiol.* 35:464-468.
156. Soltis, D.E., P.S. Soltis, D.R. Morgan, S.M. Swensen, B.C. Mullin, J.M. Dowd, P.G. Martin. 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2647-2651.
157. Smith, D.R., L.A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, H. Safer, D. Patwell, S. Prabhakar, S. McDougall, G. Shimer, A. Goyal, S. Pietrokovski, G.M. Church, C.J. Daniels, J.-I. Mao, P. Rice, J. Nölling & J. Reeve. 1997. Complete genome sequence of *Me-*

- thanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179:7135-55.
158. Smith, E.F. & C.O. Townsend. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25:671-673.
159. Souza, V. & L.E. Eguiarte. 1997. Bacteria gone native vs bacteria gone awry?: Plasmid transfer and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5501-5503.
160. Spaink, H.P., C.A. Wijffelman, E. Pees, R.J.H. Okker & B.J.J. Lugtenberg. 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328:337-340.
161. Spaink, H.P.A., H.M. Wijfes & B.J.J. Lugtenberg. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 177:6276-6281.
162. Sprent, J.I. 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 146.
163. Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G.M. Garrity, A.D. Grimont, P. Kämpfer, M.C.J. Maiden, X. Nesme, R. Roselló-Mora, J. Swings, H.G. Trüper, L. Vauterin, A.C. Ward, W.B. Whitman. 2002. Report of the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047.
164. Starr, M.P. & J.E. Weiss. 1943. Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagine medium. *Phytopathol.* 33:314-318.
165. Stepkowski, T., M. Czaplinska, K. Miedzinska, L. Moulin. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:483-94.
166. Sullivan, J.T., N.P. Heather, W.L. Lowther, D.B. Scott & C.W. Ronson. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:8985-8989.
167. Sullivan, J.T. & C.W. Ronson. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *pherRNA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5145-5149.
168. Sullivan, J.T., J.R. Trzebiatowski, R.W. Cruickshank, J. Gouzy, S.D. Brown, R.M. Elliot, D.J. Fleetwood, N.G. McCallum, U. Rossbach, G.S. Stuart, J.E. Weaver, R.J. Webby, F.J. de Bruijn & C.W. Ronson. 2002. Comparative sequence analysis of the symbiotic island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* 184:3086-3095.
169. Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. García, A. Willems, P. de Lajudie, I. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson & B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183:214-220.
170. Tan, Z.Y., F.L. Kan, G.X. Peng, E.T. Wang, B. Reinhold-Hurek & W.X. Chen. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semiarid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:909-914.
171. Terefework, Z., G. Nick, S. Soumalainen, L. Paulin & K. Lindström. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:349-356.
172. Tesfaye, M., D.J. Petersen & B.H. Holl. 1997. Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species. *Can. J. Microbiol.* 43:526-533.
173. Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
174. Toledo, I., L. Lloret & E. Martínez-Romero. 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:54-64.
175. Trinick, M.J. 1979. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. *Can. J. Microbiol.* 25:565-78.
176. Trinick, M.J. 1980. Relationships among the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49:39-53.
177. Turner, S.L. & J.P. Young. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* 17:309-319.
178. Turner, S.L., X.X. Zhang, F.D. Li & P.W. Young. 2002. What does bacterial genome sequence represent? Mis-assignment of MAFF 303099 to the genospecies *Mesorhizobium loti*. *Microbiol.* 148:3330-3331.
179. Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro & T. Matsuguchi. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* 177:141-1417.
180. van Berkum, P., D. Beyene, G. Bao, T.A. Campbell & B.D. Eardly. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:13-22.
181. van Berkum, P., F. Ruihua, T.A. Campbell & D.Eardly. 1999. Some issues of relevance in the taxonomy of rhizobia, pp. 267-269. In Martínez, E & G. Hernández (Eds). *Highlights of Nitrogen Fixation Research*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
182. van Berkum, P., Z. Terefework, L. Paulin, S. Soumalainen, K. Lindström & B.D. Eardly. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* 185:2988-2998.
183. Vandamme, P., J. Goris, W-M. Chen., P. de Vos & A. Willems. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:507-512.
184. Vanechoutte, M., Peter Kämpfer, T. De Baere, E. Falsen & G. Verschaegen. 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:317-327.
185. van Rhijn, P. & J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142.
186. Velázquez, E., J.M. Igual, A. Willems, M.P. Fernández, E. Munoz, P.F. Mateos, A. Abril, N. Toro, P. Normand, E. Cervantes, M. Gillis & E. Martínez-Molina. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1011-1021.
187. Vinuesa, P., M. Leon-Barrios, C. Silva, A. Willems, A. Jarabo-Lorenzo, R. Perez-Galdona, D. Werner & E. Martínez-Romero. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont isolated from the nodules of endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteae) growing in the Canary Islands. In press.
188. Wagner, G.M. 1997. *Azolla*: A review of its biology and utilization. *Bot. Rev.* 63: 1-26.
189. Wang, E.T., P. van Berkum, D. Beyene, X.H. Sui, O. Dorado, W.X. Chen & E. Martínez-Romero. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 687-699.
190. Wang, E.T., J. Martínez-Romero & E. Martínez-Romero. 1999. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Mol. Microbiol.* 8:711-724.
191. Wang, E.T., P. van Berkum, S.H. Sui, D. Beyene, W.X. Chen & E. Martínez-Romero. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:51-65.
192. Wang, E.T., M.A. Rogel, A. García-de los Santos, J. Martínez-Romero, M.A. Cevallos, E. Martínez-Romero. 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1479-91.
193. Wang, E.T. & E. Martínez-Romero. 2000. Phylogeny of root and stem nodule bacteria associated with legumes. In: Prokar-

- otic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Triplet, E. ed. Horizon Scientific Press. Madison, Wisconsin. pp 177-186.
194. Wang, E.T., Z.Y. Tan, A. Willems, M. Fernández-López, B. Reinhold-Hurek & E. Martínez-Romero. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1687-1693.
195. Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr & H.G. Trüper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 463-464.
196. Wei, G.H., E.T. Wang, Z.Y. Tan, M.E. Zhu & W.X. Chen. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:2231-2239.
197. Wei, G.H., Z.Y. Tan, M.E. Zhu, E.T. Wang, S.Z. Han & W.X. Chen. 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1575-1583.
198. Wernegreen, J.J. & M.A. Riley. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. Mol. Biol. Evol. 16:98-113.
199. Willems, A. & M.D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of *rhizobia* and *agrobacteria* based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:305-313.
200. Willems, A., M. Fernández-López, E. Muñoz-Adelantado, J. Goris, P. De Vos, E. Martínez-Romero, N. Toro & M. Gillis. 2003. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1207-1217.
201. Woese, C.R., E. Stackebrandt, W.G. Weisburg, B.J. Paster, M.T. Madigan, V.J. Fowler, C.M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K.H. Nealson & G.E. Fox. 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. Syst. Appl. Microbiol. 5:315-326.
202. Woese, C. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271.
203. Woese, C.R., O. Kandler & M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:4576-4579.
204. Woese, C. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:8392-8396.
205. Woese, C. 2002. On the evolution of cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:8742-8747.
206. Wood, D.W., et al Wood D.W., J.C. Setubal, R. Kaul, D.E. Monks, J.P. Kitajima, V.K. Okura, Y. Zhou, L. Chen, G.E. Wood, N.F. Almeida Jr, L. Woo, Y. Chen, I.T. Paulsen, J.A. Eisen, P.D. Karp, D. Bovee Sr, P. Chapman, J. Clendenning, G. Deatherage, W. Gillet, C. Grant, T. Kutuyavin, R. Levy, M.J. Li, E. McClelland, A. Palmieri, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, Z. Wu, P. Romero, D. Gordon, S. Zhang, H. Yoo, Y. Tao, P. Biddle, M. Jung, W. Krespan, M. Perry, B. Gordon-Kamm, L. Liao, S. Kim, C. Hendrick, Z.Y. Zhao, M. Dolan, F. Chumley, S.V. Tingey, J.F. Tomb, M.P. Gordon, M.V. Olson & E.W. Nester. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science 294:2317-2323.
207. Xiong J., W.M. Fischer, K. Inoue, M. Nakahara & C.E. Bauer. 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. Science 289:1724-1730.
208. Xu, L.M., C. Ge, Z. Cui, J. Li & H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 706-711.
209. Yanagi, M. & K. Yamasato. 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol. Lett. 107:115-120.
210. Yang, G.P., F. Debellé, A. Savagnac, M. Ferro, O. Schiltz, F. Maillet, D. Promé, M. Treilhou, C. Vialas, K. Lindstrom, J. Dénarié & J.C. Promé. 1999. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with α,β -unsaturated N-acyl substitutions. Mol. Microbiol. 34:227-237.
211. Yao, Z.Y., F.L. Kan, E.T. Wang, G.H. Wei & W.X. Chen. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:2219-2230.
212. Yap, W.H., Z. Zhang & Y. Wang. 1999. Distinct types of rRNA Operons exist in the genome of the actinomycete *Thermonospora chromogena* and Evidence for Horizontal Transfer of an Entire rRNA Operon. J. Bacteriol. 181:5201.
213. Young, J.M., L.D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:89-103.
214. Young, J.M., L.D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* – a reply to Farrand et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1689-1695.
215. Young, J.P.W. & A.W.B. Johnston. 1989. The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. Trends Ecol. Evol. 4:341-349.
216. Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. In: Biological Fixation. Stacey, G., Burris, H.R. & Evans, H.J. (eds.). Chapman and Hall, New York. pp 43-79.
217. Young, J.P.W. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant Soil 186:45-52.
218. Young, J.P.W. & K.E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol. 133:87-94.
219. Zehr, J.P., M. Wyman, V. Miller, L. Duguay & D.G. Capone. 1993. Modification of the Fe protein of nitrogenase in natural populations of *Trichodesmium thiebautii*. Appl. Environ. Microbiol. 59:669-676.

Correspondence to:

Esperanza Martínez-Romero

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Tel.: +52-777-3-29-16-97

Fax: +52-777-3-17-55-81

E-mail: emartine@ccg.unam.mx