

CAPÍTULO 11

ECOLOGÍA EVOLUTIVA DE BACTERIAS Y EL CONCEPTO DE ESPECIE: EL CASO DE LOS RIZOBIOS

Claudia Silva y Pablo Vinuesa

En este capítulo se revisan aspectos clave de genética de poblaciones y evolución de procariontes, con énfasis en el grupo de las bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobios. En la primera parte abordamos la ecología y la evolución de la interacción rizobios-leguminosas. La segunda parte toca el intercambio genético en bacterias y los conceptos de especie empleados en biología y en particular en bacteriología. En la tercera parte exponemos los resultados de nuestros estudios sobre genética de poblaciones, filogenia y sistemática molecular de rizobios asociados a leguminosas silvestres y cultivadas; en la última parte presentamos algunas conclusiones a las que hemos llegado sobre la evolución bacteriana a través del estudio de estos organismos.

LA INTERACCIÓN RIZOBIOS-LEGUMINOSAS

ECOLOGÍA DE LOS RIZOBIOS

Las bacterias que ocupan los nódulos de plantas leguminosas son un grupo polifilético colectivamente llamado rizobios (Sadowsky y Graham, 1998; Sawada *et al.*, 1993). La característica fenotípica que las distingue de otras bacterias es su habilidad de disparar el desarrollo de órganos fijadores de nitrógeno, llamados nódulos, en las raíces o tallos de plantas hospederas específicas que,

con una excepción, son leguminosas (Long, 1989; van Rhijn y Vyerleyden, 1995; Sadowsky y Graham, 2002).

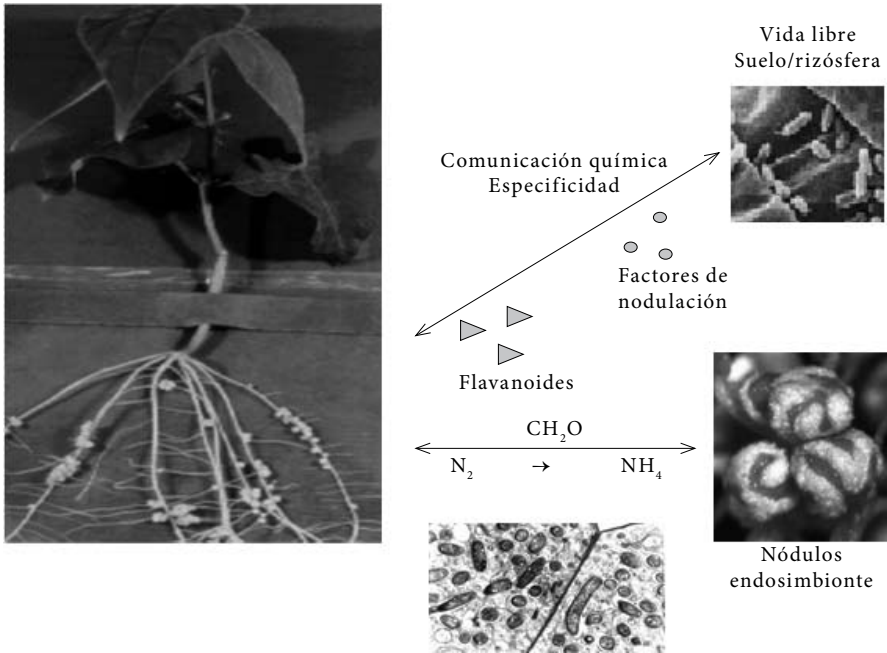
A pesar de que la simbiosis establecida entre rizobios y leguminosas es la interacción planta-bacteria más estudiada (Spaink *et al.*, 1998; Sadowsky y Graham, 2002), el conocimiento que tenemos sobre la ecología de los rizobios es limitado y fragmentado (Sadowsky y Graham, 1998). Los rizobios cubren un espectro ecológico muy amplio: se les encuentra como saprófagos en el suelo y el agua dulce, viven como rizobacterias en la rizósfera de leguminosas y otras plantas, y pueden colonizar el nicho ecológico único de los nódulos en los que, tras ser endocitados por las células del hospedero, se diferencian en bacteroides. En sus historias de vida alterna estadios de vida libre en el suelo y la rizósfera, con estadios endosimbióticos en los que se alojan en un compartimiento intracelular del tejido central del nódulo, denominado simbiosoma (figura 1; Brewin, 1998; Sadowsky y Graham, 1998).

La asociación con los rizobios permite a las leguminosas colonizar exitosamente hábitats deficientes en nitrógeno, donde otras plantas crecen difícilmente. La asociación con las leguminosas beneficia directamente a las poblaciones de rizobios dentro de los nódulos al proporcionarles protección y fuentes de carbono, e indirectamente a las poblaciones de la rizósfera al suministrarles compuestos necesarios para su crecimiento a través de los exudados de las raíces (Long, 1989; Brockwell *et al.*, 1995; Sadowsky y Graham, 2002). Esta interacción se considera una simbiosis mutualista (Long, 1989; Spaink *et al.*, 1998), pero al no ser obligatoria, se trata más de una relación de protocooperación que de mutualismo en sentido estricto (Cheng, 1991).

UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS RIZOBIOS Y EVOLUCIÓN DE LA SIMBIOSIS

En la actualidad la clasificación taxonómica de las bacterias está basada principalmente en las secuencias del gen *rrs* que codifica para la subunidad 16S de rARN (Woese *et al.*, 1990; Weisburg *et al.*, 1991; Ludwig y Schleifer, 1994). Esta clasificación ubica a la mayoría de los rizobios en la subclase α de las Proteobacterias (Willems y Collins, 1993; Young, 1993; Martínez, 1994; Young y Haukka, 1996). En la clasificación actual reconocida en el Manual de Bergey (Madigan *et al.*, 2000) los rizobios se encuentran en cuatro familias del orden Rhizobiales: Rhizobiaceae, que incluye los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*; Phyllobacteriaceae, que contiene a *Mesorhizobium*; Hyphomicrobiaceae, que incluye a *Azorhizobium*; y Bradyrhizobiaceae, que incluye

Figura 1. Los rizobios son bacterias heterótrofas aerobias que viven en el suelo como saprófagos. Cuando una leguminosa compatible está presente se establece una estrecha comunicación química que es la base de la simbiosis. Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides que activan la expresión de los genes de nodulación de los rizobios, que se encargan de producir y secretar los factores que disparan la organogénesis de los nódulos. Los rizobios infectan las células de los nódulos, dentro de ellas se diferencian en bacteroides y llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. La planta provee de carbohidratos a los bacteroides dentro del nódulo para sostener su metabolismo. Esta interacción es una simbiosis protocooperativa ya que no es obligatoria para ninguno de los dos simbioses



el género *Bradyrhizobium*. Los géneros de rizobios están filogenéticamente relacionados con otras bacterias de vida libre o patogénicas, como *Rhodospseudomonas*, *Azospira*, *Agrobacterium* y *Brucella* (Willems y Collins, 1993; van Berkum y Eardly, 1998; Sadowsky y Graham, 2002).

Sin embargo, el concepto de rizobios está cambiando, ya que recientemente se reportó una metilobacteria (α -Proteobacteria) noduladora y fijadora, pro-

puesta como *Methylobacterium nodulans* (Sy *et al.*, 2001). Asimismo, se está haciendo patente que la fijación simbiótica de nitrógeno por β -proteobacterias es más común de lo que se había pensado: recientemente se han identificado bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* que son capaces de ocupar nódulos de leguminosas y fijar nitrógeno (Chen *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

La distribución de los rizobios en las subclases α y β de las Proteobacterias, con raíces filogenéticas profundas y mezclados con bacterias no simbióticas (Young, 1993; Martínez, 1994), genera preguntas sobre la evolución de la simbiosis. ¿Evolucionó independientemente en varios linajes de Proteobacterias? ¿Surgió en su ancestro común y se perdió en sus parientes no simbióticos? ¿Se desarrolló en un linaje y fue transferido a otros? El tiempo de divergencia calculado entre linajes de rizobios, por ejemplo *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, muestra que su ancestro común vivió antes del origen de las plantas terrestres (Turner y Young, 2000), por lo que la hipótesis de un ancestro simbiótico queda prácticamente descartada. Las reconstrucciones filogenéticas de los genes *nod* indican un ancestro común entre ellos (Ueda *et al.*, 1995; Wernegreen y Riley, 1999; Laguerre *et al.*, 2001), por lo que la hipótesis de evolución independiente es poco probable. La hipótesis más apoyada por las evidencias es la de un linaje simbiótico único del que se transfirió lateralmente la información a otros (Young y Johnston, 1989).

LOS DIFERENTES COMPARTIMIENTOS DEL GENOMA DE LOS RIZOBIOS

La arquitectura genómica de los individuos de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* está constituida por un cromosoma circular y varios plásmidos (Freiberg *et al.*, 1996; Galibert *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003). El cromosoma tiene entre 4 000 y 5 000 kilobases (kb, miles de pares de bases) y los plásmidos pueden ser de tamaño variable, de 25 kb hasta cerca de 2 000 kb. La mayoría de los genes necesarios para establecer la nodulación y fijación de nitrógeno se localizan en uno de los plásmidos, denominado plásmido simbiótico. En *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* la presencia de plásmidos es menos frecuente; estas bacterias tienen un cromosoma de entre 8 000 y 9 000 kb y la información genética para la simbiosis suele estar agrupada en una región del cromosoma llamada isla simbiótica (Kaneko *et al.*, 2000, 2002; Romero y Brom, 2004). Hasta el momento se han secuenciado los genomas completos de *S. meliloti* 1021, *M. huakuii* MAFF 303099, *B. japonicum* USDA110 (Galibert

et al., 2001; Kaneko *et al.*, 2000, 2002), y están en proceso de anotación los de *R. leguminosarum* 3841 y *R. etli* CFN42. Se conoce la secuencia completa de los plásmidos simbióticos de *S. fredii* NGR234 y *R. etli* CFN42 (Freiberg *et al.*, 1996; González *et al.*, 2003).

Una de las islas simbióticas mejor estudiadas es la de *M. loti* R7A. Esta cepa fue introducida junto con las semillas de *Lotus corniculatus* en un campo de Nueva Zelanda donde no había rizobios nativos capaces de nodular a esta leguminosa. Siete años después se descubrió que los aislados de los nódulos eran genéticamente diversos, pero compartían la misma isla simbiótica cromosomal (Sullivan *et al.*, 1995). El análisis genético de los aislados permitió comprobar que las poblaciones de rizobios nativos, desprovistos de la capacidad de nodular a la leguminosa introducida, adquirieron por transferencia lateral la isla simbiótica de la cepa introducida (Sullivan *et al.*, 1996; Sullivan y Ronson, 1998).

El genoma de los rizobios cuenta con características que le permiten perder y adquirir información simbiótica frecuentemente en la naturaleza, y el descubrimiento de que en condiciones naturales la información simbiótica se transfiere y que la mayoría de los rizobios del suelo carece de información simbiótica, ha marcado un parte-aguas en nuestro entendimiento de la ecología evolutiva de los rizobios (Soberón-Chavez y Nájera, 1988; Segovia *et al.*, 1991, 1995, 1996; Wernegreen y Riley, 1999). El dinamismo del compartimiento simbiótico del genoma de los rizobios les permite adaptarse a condiciones ambientales cambiantes, como la presencia de una nueva leguminosa en un sitio determinado. Los caminos evolutivos de la simbiosis pueden vislumbrarse a través de la comparación de las historias evolutivas de los loci cromosomales de mantenimiento y los loci adaptativos involucrados en la simbiosis (Wernegreen y Riley, 1999).

GENÉTICA DE POBLACIONES Y EVOLUCIÓN EN BACTERIAS

EL PAPEL DEL INTERCAMBIO GENÉTICO EN LA EVOLUCIÓN BACTERIANA

Existen dos procesos fundamentales en la transferencia lateral de información entre bacterias. Uno mediado por recombinación homóloga, en el que se sustituyen fragmentos de ADN existentes (véase el capítulo 9 de este libro), y el otro mediado por recombinación sitio específica o aún ilegítima, en la que

se introducen al genoma nuevos fragmentos de ADN (Snyder y Champness, 1997; Gogarten *et al.*, 2002). La frecuencia y la naturaleza de estos procesos tienen consecuencias sobre la estructura genética y los mecanismos de evolución de las bacterias.

En las poblaciones clonales, en las que las células madre dan lugar a dos células hijas por fisión binaria, la variación surge por mutaciones transferidas a los descendientes de las células en que surgieron, y los nuevos linajes se forman por la acumulación de mutaciones sucesivas con el paso de las generaciones. Este tipo de transferencia de información genética se conoce como vertical, mientras que la transferencia horizontal se refiere al movimiento de información genética entre células que no necesariamente comparten un ancestro reciente (Spratt y Maiden, 1999; Gogarten *et al.*, 2002). Se conocen tres mecanismos generales por los que las bacterias pueden transferir lateralmente información genética: conjugación, transformación y transducción (véase el capítulo 9 de este libro). Estos mecanismos sexuales, o más bien parasexuales, difieren en muchos aspectos de los mecanismos sexuales de los eucariontes: son unidireccionales, de un donador a un receptor; se transfiere sólo una fracción del genoma, que puede involucrar desde algunos pares de bases a cientos de kilobases, dependiendo principalmente del mecanismo de transferencia; están desacoplados de la reproducción, por lo que estos eventos no necesariamente ocurren en cada generación: una frecuencia de recombinación de 10^{-5} por gen por generación se consideraría muy alta (Cohan, 1994a; Maynard Smith, 1995; Gogarten *et al.*, 2002).

La contribución relativa de la recombinación en comparación con la de la mutación en la generación de nuevos genotipos varía entre especies y poblaciones bacterianas, y conforme la primera aumenta, la clonalidad de la población disminuye. Existe un amplio espectro de estructuras poblacionales, cuyos extremos son la alta clonalidad, como en *Salmonella enterica*, *Pseudomonas syringae* y *Borrelia burgdorferi*, y la ausencia completa de clonalidad, como en *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Helicobacter pylori*, pero se considera que la mayoría, incluyendo *Escherichia coli*, *Rhizobium etli*, *R. gallicum* y varias especies de *Bradyrhizobium*, contiene elementos clonales y no-clonales (Dykhuizen *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1992; Maynard Smith *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1995; Holmes *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999; Spratt y Maiden, 1999; Maggi Solcà *et al.*, 2001; Sakar y Guttman, 2004; Vinuesa *et al.*, 2005c).

Si las poblaciones fueran sólo clonales, los diferentes linajes que surgen por mutación serían independientes, estarían sujetos a los efectos de la selección periódica y las filogenias derivadas de sus genes podrían equipararse con la

evolución de los linajes. Su estudio se relacionaría más con el cladismo que con la genética de poblaciones (Maynard Smith, 1995; Levin y Bergstrom, 2000). Si las poblaciones fueran no-clonales, se esperaría una diversidad genética elevada y escaso ligamiento entre genes, los supuestos de la genética de poblaciones encontrarían cabida, pero los análisis filogenéticos de los genes no podrían reconstruir la historia evolutiva de los linajes (Maynard Smith, 1995; Gogarten *et al.*, 2002).

El gran reto en el estudio de la genética de poblaciones y las relaciones evolutivas de bacterias está en determinar las contribuciones relativas de los procesos que generan la variación genética (mutaciones puntuales y recombinación) y las fuerzas que subsecuentemente determinan sus caminos evolutivos (la selección y la deriva génica). Las relaciones entre estas fuerzas evolutivas son complejas, y pueden diferir entre y dentro de especies bacterianas y entre regiones de un genoma (Li, 1997; Nei y Kumar, 2000; Lawrence, 2002).

El estudio de la recombinación en bacterias se ha enfocado en el análisis de la estructura mosaico dentro de los genes, que aporta la evidencia molecular de eventos de recombinación intragénica, y del desequilibrio de ligamiento entre alelos de diferentes loci, que provee de evidencia estadística de recombinación intergénica, así como en la comparación de los árboles genealógicos de diferentes genes que pueden reflejar historias evolutivas distintas para diversas regiones del genoma (Maynard Smith, 1995; Spratt y Maiden, 1999; Feil y Spratt, 2001; véase también el capítulo 9 de este libro). Cuando los datos analizados son secuencias nucleotídicas, en ciertos casos es posible trazar la historia de la recombinación y determinar qué genotipos fueron los donadores y receptores (Dykhuizen y Green, 1991; Yap *et al.*, 1999; Wang y Martínez-Romero, 2000; Brown *et al.*, 2002; van Berkum *et al.*, 2003).

Otro aspecto importante en la evolución de las bacterias es la promiscuidad del intercambio genético, ya que puede ocurrir entre linajes separados por distancias evolutivas mucho mayores que entre los eucariontes (Cohan, 1994a; Feil y Spratt, 2001). La comparación del creciente número de genomas bacterianos secuenciados muestra que han experimentado importantes eventos de transferencia lateral de información, dando origen a cromosomas mosaico de secuencias ancestrales y de genes adquiridos horizontalmente (Nelson *et al.*, 1999; Galibert *et al.*, 2001; PeARN *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2002). En el caso de las bacterias que cuentan con una parte significativa de su genoma en plásmidos, como es el caso de muchos rizobios, el análisis de las secuencias de plásmidos completos muestra también una estructura de mosaico en la que los elementos móviles como transposones y fagos parecen

tener un papel importante (Freiberg *et al.*, 1996; Freiberg *et al.*, 1997; Galibert *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003).

Se han documentado muchos ejemplos sobre los cambios significativos en el nicho y el fenotipo de una especie provocados por la adquisición de material genético. Por ejemplo, la adquisición de plásmidos, islas de patogenicidad o islas de simbiosis puede provocar el cambio entre ser simbiote comensal, patógeno o mutualista (Sullivan y Ronson, 1998; Wood *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2002). La transferencia de genes ecológicamente adaptativos permite la diversificación y especiación bacteriana, por lo que estos eventos tienen un gran impacto sobre la evolución de las poblaciones de estos organismos. Esta es una de las grandes diferencias y ventajas del intercambio genético en bacterias con respecto al de los eucariontes; las bacterias no tienen que “reinventar la rueda”: la transferencia de genes, operones e islas genómicas crean nuevos linajes con combinaciones únicas que pueden explotar nuevos nichos y generar nuevas especies o ecotipos a través de uno o unos pocos eventos evolutivos (Ward, 1998; Lawrence, 1999, 2002; Gogarten *et al.*, 2002).

Este tipo de eventos de recombinación y transferencia lateral son los que pudieron haber ocurrido durante la evolución de la simbiosis entre rizobios y leguminosas, y que ocurren actualmente en el campo. Dentro del grupo de los rizobios existe evidencia de transferencia de islas simbióticas (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1996; Vinuesa *et al.*, 2004a) y plásmidos simbióticos entre especies (Segovia *et al.*, 1991; Amarger *et al.*, 1997; Brom *et al.*, 2002), y dentro de especies en condiciones naturales (Silva *et al.*, en preparación; Schofield *et al.*, 1987; Young y Wexler, 1988; Louvrier *et al.*, 1996; Wernegreen *et al.*, 1997; Wernegreen y Riley, 1999; Silva *et al.*, 2003) y de laboratorio (Hooykaas *et al.*, 1977, 1982; Hooykaas y Schilperoort, 1984; Truchet *et al.*, 1984; Martínez *et al.*, 1987; Sivakumaran *et al.*, 1997; Rogel *et al.*, 2001).

Estimaciones de desequilibrio de ligamiento han evidenciado recombinación homóloga intergénica cromosomal en poblaciones locales de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Souza *et al.*, 1992; Gordon *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1999, 2003; Vinuesa *et al.*, 2004a) y dentro de *S. meliloti*, *S. medicae* y los tipos A y B de *R. tropici* (Gordon *et al.*, 1995). Hay evidencia de recombinación cromosomal intragénica del gen *glnII* entre *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Turner y Young, 2000), en el gen *rrs* entre especies de *Rhizobium* (Silva *et al.*, en preparación; Eardly *et al.*, 1996; Terefework *et al.*, 1998), en el gen *rrl* de especies de *Bradyrhizobium* (Parker, 2001), así como dentro del operón *rrn* (van Berkum *et al.*, 2003). La evidencia de campo y laboratorio sobre la importancia de la transferencia lateral en la evolución de los rizobios se ha

reforzado con el análisis de los genomas completos y plásmidos simbióticos secuenciados (Freiberg *et al.*, 1997; Kaneko *et al.*, 2000, 2002; Galibert *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003).

A pesar del potencial de intercambio genético en bacterias, los procariontes forman grupos fenotípicos y genéticos discretos que constituyen linajes genéticos coherentes (Cohan, 1994b; Maynard Smith, 1995; Wernegreen y Riley, 1999; véase también el capítulo 10 de este libro). El equilibrio de ligamiento dentro, pero no entre grupos genéticos, sugiere restricciones genéticas a la recombinación.

AISLAMIENTO SEXUAL EN BACTERIAS

Se plantea que la transferencia horizontal de información fue la fuerza primaria en la evolución celular (Woese, 2000), lo cual nos lleva a valorarla como una característica inherente a la evolución bacteriana. Inclusive la organización actual de los genes bacterianos en operones (grupos de genes que se transcriben en el mismo mARN, generalmente involucrados en una misma función; Lawrence y Roth, 1996; Snyder y Champness, 1997) sugiere que el genoma de las bacterias ha sido evolutivamente diseñado por y para la transferencia lateral de genes (Lawrence, 2000).

Se ha discutido mucho sobre el papel y la amplitud del aislamiento sexual en bacterias. La visión conservadora de que la transferencia es más frecuente entre organismos relacionados y menos frecuente entre organismos divergentes, es la más aceptada y apoyada por las evidencias, por lo que llamaremos aislamiento sexual a la disminución de la frecuencia del intercambio genético entre especies comparada con la que ocurre dentro de especies (Majewski, 2001). Sin embargo, el grado de aislamiento sexual depende de una multitud de factores que incluyen diferencia en microhábitats, diferencias en sus sistemas de restricción-modificación, divergencia en secuencia y, en el caso de intercambio mediado por plásmidos, fagos o transposones, diferencias entre los rangos de hospedero de los vectores (Cohan, 1996). La transferencia lateral exitosa requiere: 1) disponibilidad de una célula donadora o ADN libre, 2) incorporación del ADN por la célula recipiente, 3) escape del ADN incorporado del sistema de restricción de la célula recipiente, 4) formación del ADN heteroduplex, 5) escape del heteroduplex del sistema de reparación del recipiente, 6) funcionalidad del producto en el entorno genético recipiente (Majewski, 2001). El aislamiento sexual es resultado de la probabilidad de que una o más de estas condiciones no sean satisfechas.

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

No hay un consenso respecto a cuáles genes son más propensos a intercambio genético y a persistir en los genomas recipientes. Por un lado se propone que los genes más conservados en secuencia e involucrados en el mantenimiento celular, como los rARNs, son potencialmente más propensos al intercambio genético (Cohan, 1994a; Gogarten *et al.*, 2002). Bajo esta visión, la recombinación de genes responsables de las adaptaciones específicas de una población tiene mayor penalidad selectiva que la recombinación de genes que se consideran funcionalmente intercambiables (Cohan, 1994a). Por otro lado, se argumenta que es menos probable que los genes esenciales (como los rARNs) se transfieran exitosamente, ya que el taxón recipiente debe tener ortólogos funcionales que han coevolucionado con el resto de la maquinaria celular y es poco probable que puedan ser desplazados (*hipótesis de la complejidad*; Jain *et al.*, 1999; Woese, 2002)), mientras que los genes bajo selección baja o transitoria (no esenciales) pueden beneficiar a los linajes que los tienen, al otorgarles nuevas capacidades para explotar nuevos nichos (Ward, 1998; Gogarten *et al.*, 1999). El hecho es que, aunque los genes de un genoma pueden tener diferentes probabilidades de ser transferidos exitosamente (Jain *et al.*, 1999; Gogarten *et al.*, 2002; Lawrence, 2002; Woese, 2002), ninguno parece inmune a la transferencia lateral.

Se han reportado casos de transferencia tanto de genes adaptativos, como islas de patogenicidad o simbiosis (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998; Perna *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 2002; Vinuesa y Silva, 2004), genes involucrados en adaptaciones a alta temperatura (Nelson *et al.*, 1999) o en resistencia a antibióticos (Dowson *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1992; Salyers *et al.*, 1995), como de genes de mantenimiento indispensables, con funciones metabólicas centrales (Doolittle *et al.*, 1990) o en la maquinaria de síntesis de proteínas (Brochier *et al.*, 2000), en particular en el gen del 16S rARN

(Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Mylvaganam y Dennis, 1992; Eardly *et al.*, 1996; Lan y Reeves, 1998; Yap *et al.*, 1999; Sacchi *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2003; Schouls *et al.*, 2003).

El debate sobre el impacto del intercambio genético en la evolución bacteriana continúa, por lo que se plantea que es un tema que se encuentra todavía en su adolescencia conceptual (Lawrence y Hendrickson, 2003) y continúan los esfuerzos por aportar diversas evidencias a favor de posiciones contrastantes. Por ejemplo, para demostrar que la coevolución del rARN con los otros componentes del aparato de traducción no es impedimento para la transferencia horizontal de estos genes, se generó una cepa de *E. coli* con todos sus operones de rARN inactivados, la cual subsiste gracias a la introducción en un vector del operón de rARN de otros géneros bacterianos próximos (*Salmonella typhimurium* o *Proteus vulgaris*), o incluso con algunos dominios provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* (Asai *et al.*, 1999).

En un análisis basado en genomas completos agrupados por cuartetos, se comparó la topología generada por el rADN 16S con la de los demás genes ortólogos (Daubin *et al.*, 2003). Encontraron que en la mayoría de las comparaciones entre genomas de géneros diferentes, pero relacionados, se converge a una misma topología; sin embargo, al analizar genomas de una misma especie o género la convergencia hacia una misma topología es mucho menor, sugiriendo que a niveles filogenéticos profundos la transferencia lateral no obscurece las relaciones filogenéticas mientras que cuando los organismos están cercanamente relacionados el intercambio genético es más frecuente.

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

GENERALIDADES SOBRE LOS CONCEPTOS DE ESPECIE

El concepto de especie ha sido uno sobre los que más se ha escrito y uno de los que mayor controversia ha causado en la biología evolutiva (Mayr, 1970; Mayden, 1997; Cohan, 2002; véase también el capítulo 10 de este libro). El término especie se usa tanto para representar una categoría taxonómica como para representar a los individuos que se ordenan en el sistema de clasificación. Estos términos tienen dos categorías filosóficas diferentes. La categoría taxonómica de especie es una clase, que no tiene existencia real y que se usa para ordenar objetos. Las especies como individuos, están limitadas espacial

y temporalmente, tienen cohesión intrínseca, se reproducen, participan en los procesos naturales y cambian con el tiempo.

Gran parte de los problemas sobre los conceptos de especie se relacionan con la confusión de estos dos significados críticamente diferentes (Mayr, 1970; Mayden, 1997; Cohan, 2002). Las reglas de nomenclatura formales han reforzado la visión de las especies como clases y no como individuos. En la literatura taxonómica, sistemática y evolutiva se han desarrollado al menos 22 conceptos de especie que pueden ser agrupados en tres clases básicas: la primera incluye a los conceptos que requieren similitud, la segunda a los que se basan en la monofilia y la tercera a los que requieren aislamiento reproductivo (Hull, 1997; Mayden, 1997). A continuación discutiremos algunos de los más utilizados y representativos. Para una revisión más exhaustiva recomendamos el libro *Species: the units of biodiversity* (Claridge et al., 1997; véase también el capítulo 10 de este libro).

La mayoría de los conceptos de especie están basados en similitud, los más conocidos son los conceptos morfológico, taxonómico, fenético y ecológico. Las especies son, en el concepto morfológico “poblaciones separadas por una discontinuidad en una serie de biotipos”, en el concepto taxonómico “todos los especímenes que un taxónomo considere que son miembros de una misma clase”, en la definición fenética “el nivel de especie es aquel en el que distintos grupos fenéticos pueden ser observados”, y en la definición ecológica “son linajes que ocupan una zona adaptativa mínimamente diferente de la de otros linajes”. Estas definiciones se basan en determinar que la variación de un conjunto de caracteres es menor dentro de un grupo que entre grupos, y las especies son los grupos más pequeños que exhiben el grado apropiado de similitud.

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

Entre los conceptos de especie basados en monofilia, el más representativo es el concepto filogenético, en el que una especie es el grupo monofilético más inclusivo definible por al menos una autoapomorfia (carácter derivado

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

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

Un concepto de especie que tiene gran importancia teórica y que no cae en ninguna de las categorías antes descritas es el concepto evolutivo. Bajo este concepto, una especie es un linaje que evoluciona separadamente de otros, que tiene sus propias tendencias y papeles evolutivos. Esta definición de especie es universalmente aplicable, tiene perspectiva de linaje y se fundamenta en la teoría de la evolución. El principal problema que presenta es que es operacionalmente difícil, ya que se plantea que es la evolución la que produce linajes con identidad y cohesión, y este proceso es difícil de medir (Hull, 1997; Mayden, 1997). Para introducir mecanismos operacionales en el concepto evolutivo, se creó el concepto cohesivo de especie, en el que una especie es un linaje evolutivo cuyos límites surgen por fuerzas genéticas y ecológicas que crean comunidades reproductivas cohesivas. Bajo esta definición,

la tarea básica del investigador es identificar los mecanismos de cohesión que mantienen a un grupo como un linaje evolutivo (Templeton, 1989). Sin embargo, las definiciones científicas teóricas no suelen introducir los criterios de aplicación en sus definiciones; incluir mucha terminología o datos empíricos dentro del cuerpo de una definición puede ser contraproducente (Hull, 1997), por lo que consideramos que el concepto evolutivo provee de una definición evolutiva más clara.

Dada la necesidad teórica y práctica de contar con un cuerpo teórico que nos permita manejar la diversidad biológica, es necesario establecer un concepto de especie que pueda ser aplicado a la totalidad del mundo vivo. La solución no es agrupar distintos componentes de varios conceptos. Por el contrario, el agrupar criterios discordantes en un solo concepto ha generado en gran medida el debate alrededor del concepto de especie (Mayden, 1997). Consideramos que el concepto evolutivo es mejor, ya que tiene fundamento teórico y es aplicable a todo el mundo vivo. Es el único que es consistente con el conocimiento teórico y empírico que tenemos sobre la diversificación del mundo vivo, es consistente con el estatus de individuo de las especies y engloba todos los tipos de entidades biológicas. El principal inconveniente es que es poco operacional en su definición, por lo que estamos de acuerdo con Mayden (1997) en que el concepto evolutivo sea utilizado como el concepto de especie primario y que los demás sean aplicados como conceptos secundarios supeditados al concepto primario (figura 2).

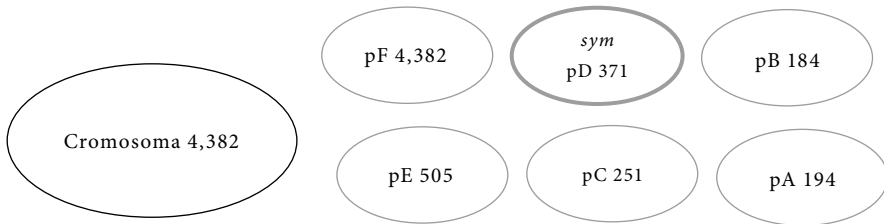
LOS CONCEPTOS DE ESPECIE EN BACTERIAS

El desarrollo de técnicas cada vez más avanzadas para explorar la diversidad microbiana nos ha permitido conocer con mucha mayor profundidad la biología de las bacterias. Estas herramientas han aportado luz sobre la complicada manera en que este enorme grupo de organismos se organiza, desde el nivel ecológico hasta el molecular. El desarrollo de técnicas que permiten conocer la diversidad bacteriana no cultivable y la observación *in situ* de sus comunidades, ha abierto nuevos horizontes en la ecología microbiana.

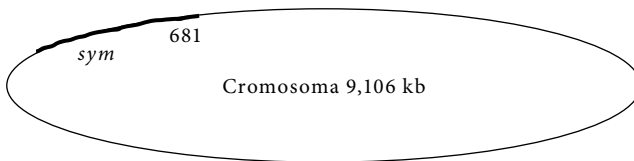
Existen más de 100 genomas bacterianos completamente secuenciados (www.ncbi.nlm.nih.gov). Su análisis comparativo ha mostrado la gran plasticidad genómica y genética de las bacterias, también ha mostrado que el genoma bacteriano es un mosaico y que la transferencia lateral de información genética juega un papel importante en su evolución (Lawrence, 1999; Doolittle, 2002). Una conclusión derivada del mosaicismo presente en los genes y genomas de

Figura 2. A) Genoma de la cepa tipo de *Rhizobium etli* CFN42 aislada de un nódulo de frijol. El genoma consiste de un cromosoma circular y seis plásmidos (pA-F). La mayor parte de los genes involucrados en la simbiosis se localizan en uno de los plásmidos, llamado plásmido simbiótico (*sym*). B) Genoma de la cepa *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 aislada de un nódulo de soya. El genoma consiste de un solo cromosoma circular y los genes simbióticos se encuentran agrupados en una región llamada isla simbiótica (*sym*)

A) Genoma de *Rhizobium etli* CFN42^r (kb)



B) Genoma de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (kb)



las bacterias es que las filogenias derivadas de un solo gen no necesariamente reflejan la historia evolutiva de los organismos (Nelson *et al.*, 1999; Doolittle, 2002). Esta conclusión tiene fuertes repercusiones sobre la sistemática bacteriana, ya que ésta se basa en gran medida en las relaciones filogenéticas de un solo gen, el gen *rrs*.

Aún con el gran avance que han experimentado recientemente las áreas de la ecología y evolución bacteriana, el concepto de especie empleado en bacteriología se ha mantenido al margen de muchos de estos descubrimientos (Cohan, 2002). La sistemática bacteriana no ha incorporado los conceptos de especie basados en teorías evolutivas. El Comité Internacional de Sistemática Bacteriana es el encargado de establecer y recomendar los estándares mínimos para la descripción válida de especies bacterianas y pretende proveer a los bacteriólogos de una definición uniforme de especie procarionte (Stackebray

et al., 2002). En la última nota taxonómica publicada por el comité, las especies se definen de manera pragmática, operacional y universalmente aplicable: una especie es una categoría que circunscribe un grupo (preferentemente) genómicamente coherente de aislados individuales que comparten un alto grado de similitud en (varias) características independientes, probadas bajo condiciones altamente estandarizadas. La similitud ADN:ADN se mantiene como el parámetro reconocido para delimitar especies. Se ha adoptado un nivel de 70% de similitud como el estándar reconocido (*gold standard*) para determinar si dos cepas pertenecen a la misma especie y se ha utilizado el 3% de divergencia en secuencia del gen *rrs* como punto de corte para separar especies (Stackebryt y Goebel, 1994; Stackebryt *et al.*, 2002). Así en bacteriología se ha usado un concepto de especie arbitrario (Maynard Smith, 1995; Ward, 1998). Es un concepto generado *ad hoc* para bacterias y no es aplicable a todos los seres vivos, si se aplicara este concepto de especie a otros seres vivos encontraríamos que, por ejemplo, todos los primates pertenecemos a la misma especie (Maynard Smith, 1995; Ward, 1998).

La definición de especie bacteriana actual se basa en el diagnóstico de similitud entre cepas. La concepción tipológica de las especies es persistente en bacteriología, ya que las especies se siguen considerando entidades estáticas (que no evolucionan) definidas por atributos típicos o esenciales (Mayr, 1970; Ward, 1998). Se designan cepas tipo y sus caracteres fenotípicos y genotípicos se consideran típicos de todos los organismos que pertenecen a esa especie. El concepto tipológico ignora el hecho de que las especies están compuestas de poblaciones naturales con una organización interna que les provee de una estructura que va más allá de una mera agregación de individuos (Mayr, 1970). El reemplazo del pensamiento tipológico por el pensamiento poblacional ha sido una de las mayores revoluciones conceptuales en biología (Mayr, 1970), pero al parecer ésta no ha llegado a la sistemática bacteriana.

En la definición de especie actual no se incluyen las nuevas evidencias y visiones sobre la evolución bacteriana, pero algunos biólogos evolutivos han tratado de proponer conceptos de especie bacteriana basados en teorías evolutivas y ecológicas. Dykhuizen y Green (1991) propusieron que se puede aplicar el concepto biológico de especie a las bacterias. Sugieren que las bacterias se pueden delimitar como grupos de cepas que recombinan entre sí pero no con cepas de otros grupos y proponen una aproximación filogenética, basada en secuencias de varios loci, para identificar los grupos que han, o no han, intercambiado genes. Esta propuesta tiene la ventaja de incorporar la teoría evolutiva a la sistemática bacteriana. Sin embargo, como ya mencio-

namos, el concepto biológico de especie *per se* tiene varios inconvenientes para ser usado como un concepto de especie en general. Dykhuizen y Green (1991) hacen el esfuerzo de acoplar este concepto de especie a bacterias con una estructura genética no totalmente clonal, como *E. coli*, pero además de que pueden existir organismos del todo clonales, la rareza y la promiscuidad en el intercambio genético entre bacterias hace que el concepto biológico de especie no pueda ser aplicado ampliamente en este grupo de organismos (Cohan, 1994b; 2002).

Cohan (2001, 2002) argumenta que el intercambio genético en bacterias no puede evitar la divergencia, dada su rareza y promiscuidad, y plantea que el aislamiento sexual es irrelevante para la evolución de divergencia permanente en el mundo bacteriano. Bajo esta visión, las especies asexuales están sujetas a su propia fuerza de cohesión, la selección natural que purga la diversidad genética dentro de las poblaciones. En este fenómeno, conocido como selección periódica, una nueva especie se forma cuando una línea asexual evoluciona hasta ocupar un nuevo nicho ecológico, de modo que la nueva especie no puede verse afectada por la selección que opera sobre los alelos adaptativos de otra población. Una vez que las poblaciones son lo suficientemente divergentes como para escapar de los eventos de selección periódica de cada una, pueden divergir permanentemente y alcanzan el estatus de especie, es decir, son ecológicamente distintas y están irreversiblemente separadas. Este autor apunta que estas propiedades universales de las especies no están presentes en las especies nombradas por los sistemáticos, sino en los ecotipos, que son organismos que ocupan el mismo nicho ecológico, cuya divergencia es purgada recurrentemente por selección natural. Las especies nombradas contienen varios ecotipos, por lo que propone que se les reconozca utilizando una clasificación latina trinomial, nombrando su género, especie y ecotipo.

La propuesta de Cohan (2002) identifica las especies como grupos monofiléticos que comparten una historia evolutiva de selección ecológica y aclara algunos de los posibles mecanismos de especiación. Sin embargo, su propuesta tiene como debilidades que la teoría evolutiva detrás de este concepto puede ponerse en duda, ya que está basada en el modelo clonal, y que no toma en cuenta que muchos caracteres adaptativos están codificados en elementos móviles y extracromosomales. La propuesta de introducir en la sistemática bacteriana el concepto de clona, complejo clonal o ecotipo dentro de una especie ya existía; se generó en el sentido de incluir ecotipos que en la actualidad se consideran especies o incluso géneros distintos, dentro de una misma especie, como el caso de muchos patógenos humanos (Lan y Reeves,

2001). Por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* son clonas de una misma especie (Helgason *et al.*, 2000) y la mayoría de las especies de *Shigella* son clonas dentro de *E. coli* (Pupo *et al.*, 2000).

Sin embargo, creemos que las especies, como conjunto de ecotipos, son la unidad evolutiva principal. Las clonas forman parte de la totalidad de la especie, a escala ecológica estructuran las poblaciones y a escala evolutiva contienen la diversidad genética de la especie. Las clonas o ecotipos nacen y se extinguen, así como los individuos y las especies. Creemos que la introducción de los ecotipos en la nomenclatura de las especies bacterianas es plausible, y de hecho se hace, como en el caso de serotipos, biovariedades, subespecies, etc. Sin embargo, no es válido transferirles los atributos de la categoría y el concepto de especie. Por ejemplo, dentro de la especie *R. etli* se reconocen tres ecotipos: los no simbióticos aislados del suelo, la biovariedad *phaseoli*, aislada de nódulos de frijol, y la biovariedad *mimosae*, aislada de nódulos de mimosas (Segovia *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1999). Segovia *et al.* (1991) demostraron que la transferencia del plásmido simbiótico de la biovar *phaseoli* convertía en simbióticos a los *R. etli* no simbióticos. Este ejemplo permite mostrar la manera en que diferentes ecotipos se relacionan entre sí y mantiene la dinámica evolutiva dentro de una especie.

TRES ESTUDIOS DE CASO CON RIZOBIOS

DIVERSIDAD DE LOS RIZOBIOS ASOCIADOS A FRIJOLES CULTIVADOS BAJO EL SISTEMA DE MILPA EN MÉXICO

Las evidencias arqueológicas, morfológicas y moleculares sugieren que el frijol cultivado evolucionó a partir de su pariente silvestre (*Phaseolus vulgaris*) y que fue domesticado en múltiples sitios de Mesoamérica y la región andina de Sudamérica hace unos 4,000 años (Singh *et al.*, 1991; Kaplan y Lynch, 1999). La llegada de los europeos a América disparó la diseminación de este cultivo hacia Europa y otras partes del mundo, y probablemente los rizobios americanos adheridos a las semillas fueron también transportados (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998). *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* es la especie que con mayor frecuencia se encuentra nodulando los frijoles en América y se ha postulado que las biovariedades *phaseoli* de diversas especies (*R. leguminosarum*, *R. gallicum* y *R. gardinii*) que nodulan al frijol surgieron por la transferencia lateral del plásmido simbiótico proveniente de *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993; Amarger *et al.*, 1997; Martínez-Romero, 2003). Actualmente el frijol se cultiva en todos los continentes y tiene gran importancia alimenticia y econó-

mica (Graham y Vance, 2003) y es probable que fuera co-domesticado con el maíz en Mesoamérica, ya que tradicionalmente se siembran juntos en el agroecosistema conocido como milpa (Souza *et al.*, 1997; Martínez-Romero, 2003). A continuación presentamos los principales resultados del análisis de la estructura genética de los rizobios asociados a frijoles cultivados bajo el sistema de milpa en México.

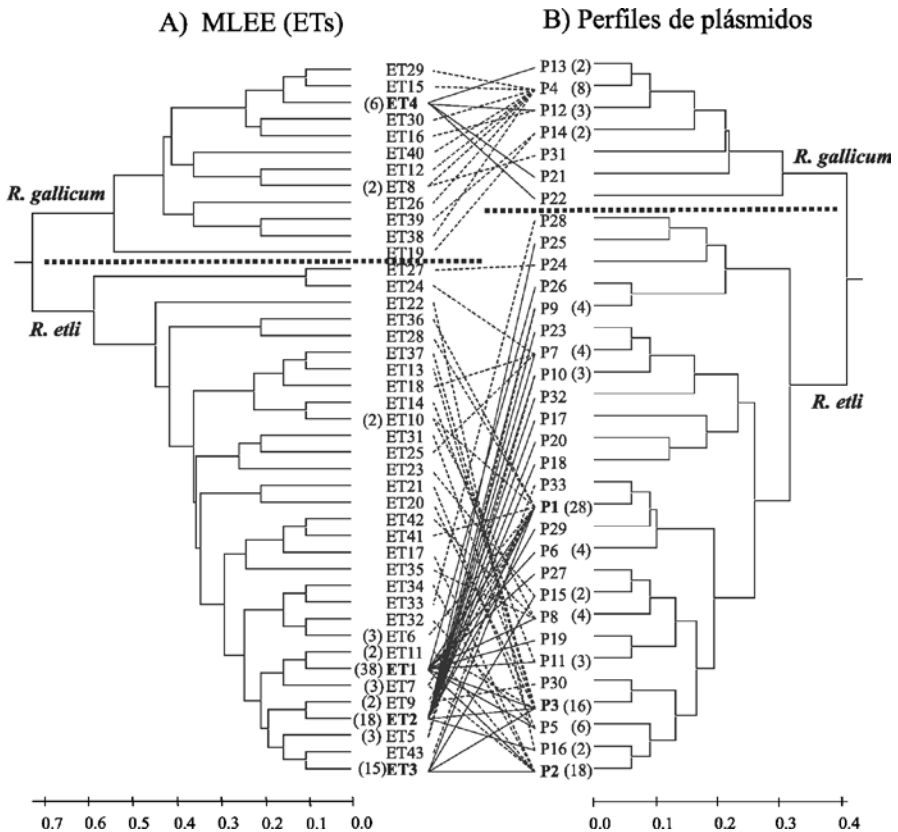
San Miguel Acuexcomac es un pueblo cercano a la ciudad de Puebla, donde se utiliza el sistema de milpa para cosechar maíz, frijol, calabaza y un gran número de hierbas que crecen en las parcelas y que se utilizan con fines alimenticios y medicinales (Souza *et al.*, 1997). Las variedades de frijol que se siembran han sido heredadas de generación en generación y son ecotipos conocidos como frijoles criollos o, en inglés, *landraces*. Con el objetivo de conocer la distribución espacial y temporal de la diversidad genética de los rizobios asociados a estas plantas de frijol, un mismo día muestreamos seis parcelas de milpa y una de las parcelas la muestreamos durante tres años consecutivos (Silva *et al.*, 1999; 2003). Para detectar la variación genética de las poblaciones de bacterias utilizamos como marcador genético la electroforesis multilocus de isoenzimas (MLEE) (véase el capítulo 18 de este libro).

Encontramos una estructura genética estable espacial y temporalmente, con una alta diversidad genética en las seis parcelas y en la parcela muestreada durante tres años ($H = 0.531$ y 0.501 , respectivamente), y una alta dominancia ecológica (50% de los nódulos estuvieron ocupados por sólo 5 genotipos multilocus). En la muestra encontramos dos grandes grupos de genotipos separados por una distancia genética de 0.7 (figura 3). Los análisis de desequilibrio de ligamiento evidenciaron intercambio genético frecuente dentro de los dos grupos pero no entre ellos, sugiriendo la existencia de una barrera genética. Este resultado fue el primer indicio de que los grupos genéticos podrían pertenecer a dos especies de rizobios, por lo que analizamos la variación genética en una muestra de 35 aislados usando otros marcadores de cromosoma y plásmidos.

El conjunto de marcadores moleculares (incluyendo secuencia parciales de tres genes cromosomales *rrs*, *glnII* y *atpD*, y dos genes simbióticos *nifH* y *nodB*), aunados a experimentos de nodulación, mostraron que los dos grupos genéticos corresponden a dos especies previamente descritas, *R. etli* bv. *phaseoli* y *R. gallicum* bv. *gallicum* (Silva *et al.*, 2003). Además, los marcadores asociados a los plásmidos mostraron evidencia de transferencia lateral de plásmidos dentro de cada grupo pero no entre ellos (figura 3). Las conclusiones principales del análisis de la estructura genética de los rizobios asociados a

los frijoles cultivados en San Miguel fueron: 1) los frijoles de las milpas están nodulados por *R. etli* y *R. gallicum*; 2) ambas especies presentan una estructura genética poblacional epidémica, que es estable en las escalas espacial y temporal analizadas; 3) el intercambio genético es una fuerza evolutiva importante en moldear sus estructuras genéticas; 4) aunque estas especies tienen

Figura 3. Dendrogramas que muestran las relaciones genéticas entre (A) genotipos cromosomales y (B) perfiles plasmídicos, así como las combinaciones cromosoma-perfil de plásmidos para 108 aislados de *R. etli* y 18 de *R. gallicum* analizados en Silva *et al.* (2003). El número de aislados está indicado en paréntesis. Las combinaciones cromosoma-perfil de plásmidos de los ETs más abundantes se indican con líneas enteras y el resto con líneas punteadas



la oportunidad ecológica para el intercambio genético, éste no es detectable, al menos para las poblaciones que ocupan los nódulos del frijol.

En este caso los análisis de genética de poblaciones nos dieron indicios de la existencia de dos especies en la muestra y los análisis filogenéticos nos permitieron establecer que se trataba de poblaciones de *R. etli* y *R. gallicum*.

BIOGEOGRAFÍA Y GENÉTICA EVOLUTIVA DE POBLACIONES DE *R. GALLICUM* Y ESPECIES RELACIONADAS

La población de San Miguel Acuexcomac fue el primer reporte de *R. gallicum* aislado de frijol en América (Silva *et al.*, 2003). Esta especie fue descrita en Francia (Amarger *et al.*, 1997) y ha sido aislada de frijol en Austria (Sessitsch *et al.*, 1997a, 1997b), España (Herrera-Cervera *et al.*, 1999; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000) y Túnez (Mhamdi *et al.*, 1999, 2002). Para obtener una mejor perspectiva sobre la población de *R. gallicum* de México y ubicarla en un contexto filogenético, secuenciamos cinco genes para algunos de los aislados de San Miguel y los reportados en diversos continentes (Silva *et al.*, 2005). Obtuvimos secuencias parciales de tres genes cromosomales indispensables para el mantenimiento celular (*rrs*, *glnII* y *atpD*) y dos genes ligados al plásmido simbiótico involucrados en la interacción simbiótica con plantas (*nifH* y *nodB*).

Los análisis filogenéticos mostraron que los alelos cromosomales de *R. gallicum* forman un grupo monofilético con los de aislados de *Medicago ruthenica*, *Coronilla varia*, *Amphicarpaea trisperma* y *Gueldenstaedtia multiflora* de diferentes regiones de China (figura 4), mientras que sus alelos simbióticos están relacionados con los de algunas especies de *Sinorhizobium* asociadas a alfalfa. Con base en criterios de taxonomía clásica (hibridaciones ADN:ADN) estos aislados fueron clasificados como *R. mongolense* y *R. yanglingense* (van Berkum *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2001). Nuestros análisis muestran que *R. mongolense* y *R. yanglingense* pertenecen al linaje evolutivo de *R. gallicum* y que constituyen un nuevo ecotipo simbiótico que proponemos nombrar biovar *orientale* (Silva *et al.*, 2005). *R. mongolense* y *R. yanglingense* ejemplifican el error frecuente de crear nuevas especies o incluso géneros con base en caracteres ecológicos codificados por elementos genéticos móviles, un asunto ampliamente documentado para algunas bacterias patógenas de humanos (Helgason *et al.*, 2000; Pupo *et al.*, 2000; Lan y Reeves 2001).

Con base en los resultados de los análisis filogenéticos decidimos nombrar al linaje evolutivo que incluye a *R. gallicum*, *R. mongolense* y *R. yanglingense* como *R. gallicum sensu lato* (en sentido amplio), ya que *R. gallicum* fue la

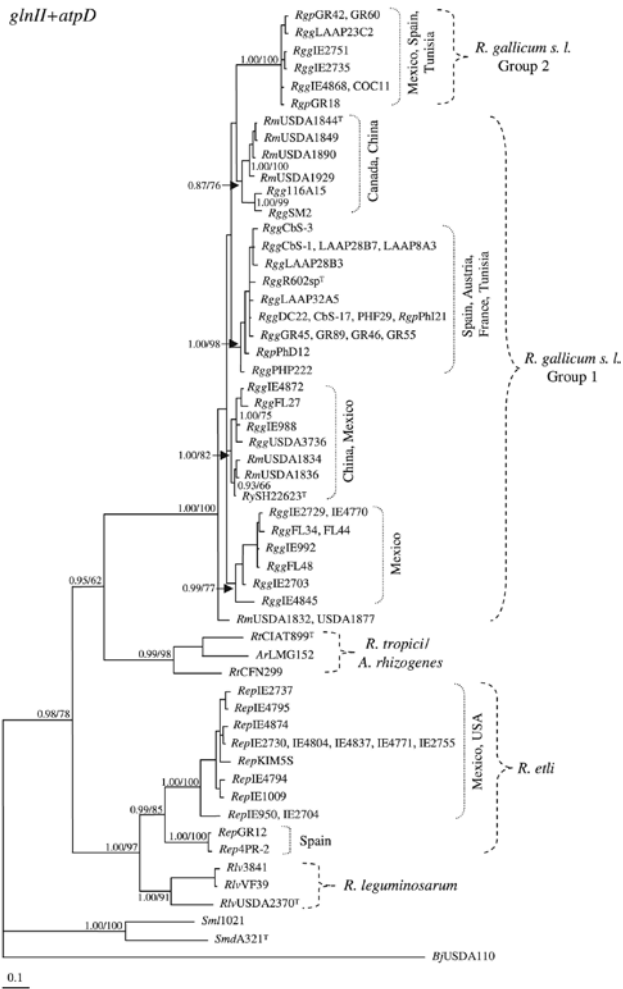
primera de las tres especies en ser descrita. En los análisis de genética de poblaciones incluimos los aislados de *R. mongolense* y *R. yanglingense* como la población de China. Tanto los análisis filogenéticos como los de genética de poblaciones basados en las secuencias de los genes *glnII* y *atpD* mostraron un patrón filogeográfico en el que las poblaciones de Francia, Austria, España y Túnez no muestran diferenciación significativa, por lo que pueden considerarse como una misma población, mientras que las de México y China mostraron diferenciación significativa con respecto a las demás.

Estos resultados indican que el flujo génico es una fuerza evolutiva que da cohesión a la especie y que sólo las poblaciones separadas a más de 10,000 km están genéticamente diferenciadas. En contraste, las secuencias del gen *rrs* no mostraron evidencia de patrón filogeográfico alguno, probablemente por los altos niveles de recombinación detectados para este gen, cuyas estimaciones están basadas en el análisis de polimorfismos de ADN. Asimismo, la inferencia filogenética mostró evidencia de transferencia lateral de alelos *rrs* entre varias especies de *Rhizobium* (Silva *et al.*, 2005). Estos resultados se unen al cúmulo de evidencias sobre la transferencia lateral del rADN entre especies bacterianas y en particular entre rizobios. Por lo tanto, sugerimos que para estudios sobre evolución, sistemática y biogeografía de bacterias es preferible utilizar como marcadores moleculares genes de mantenimiento celular que codifican para proteínas.

Los análisis filogenéticos evidenciaron la transferencia de loci simbióticos entre diversos linajes de rizobios. Sin embargo, los análisis de genética de poblaciones mostraron que la recombinación entre los diversos alelos simbióticos no es frecuente, probablemente por la presión selectiva a la que están sujetos estos genes involucrados en la interacción con los hospederos. El hecho de que cepas con fondos cromosomales monofiléticos (*R. gallicum sensu lato*) posean genotipos simbióticos divergentes (biovariedades *gallicum*, *phaseoli* y *orientale*) ejemplifica cómo una especie puede tener diferentes ecotipos sin perder su identidad (Silva *et al.*, 2005). Por esta razón, no compartimos la propuesta de Cohan (2002) sobre que los ecotipos tienen las propiedades esenciales de las especies.

En su conjunto los análisis filogenéticos y de genética de poblaciones permitieron delinear el linaje evolutivo de *R. gallicum sensu lato* y dilucidar el papel de las diferentes fuerzas evolutivas en moldear la estructura genética de este linaje, haciendo énfasis en las historias evolutivas contrastantes de los genes cromosomales de mantenimiento y los genes asociados al plásmido simbiótico, así como sus implicaciones en la sistemática bacteriana.

Figura 4. Filogenia bayesiana inferida a partir de las secuencias concatenadas de los genes *glnII* y *atpD*. En los nodos se muestran los valores de probabilidad posterior > 0.85 y los de bootstrap de máxima verosimilitud > 60%. Las cepas con haplotipos idénticos se incluyen en el mismo nodo terminal. Las cepas tipo se indican con una T. Las abreviaciones del género, especie y biovariedad de las cepas son: *Rgg* = *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum*, *Rgp* = *R. gallicum* bv. *phaseoli*, *Rm* = *R. mongolense*, *Ry* = *R. yanglingense*, *Rt* = *R. tropici*, *Ar* = *Agrobacterium rhizogenes*, *Rep* = *R. etli* bv. *phaseoli*, *Rem* = *R. etli* bv. *mimosae*, *Rlv* = *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Sml* = *S. meliloti*, *Smd* = *S. medicae*, *Bj* = *Bradyrhizobium japonicum*. Figura adaptada de Silva et al. (2005).



GENÉTICA DE POBLACIONES, FILOGENIA Y BIOGEOGRAFÍA DE
ESPECIES SIMPÁTRICAS DE *BRADYRHIZOBIUM* QUE NODULAN
LEGUMINOSAS GENISTOIDES ENDÉMICAS DE LAS ISLAS
CANARIAS

Las Islas Canarias son de origen volcánico y están situadas en el océano Atlántico muy cerca de la costa noroeste de África. En este archipiélago las leguminosas endémicas de la tribu Genisteeae son de gran importancia ecológica, ya que son especies dominantes clave en las comunidades vegetales de los ecosistemas canarios. En varios estudios se ha hecho patente que estas leguminosas están noduladas por bacterias del género *Bradyrhizobium* (Vinuesa *et al.*, 1998; Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2000). Para estudiar las poblaciones de *Bradyrhizobium* aisladas de suelos de las Islas Canarias y áreas continentales cercanas (Marruecos y el sur de España), hemos seguido un esquema de análisis jerárquico utilizando varios marcadores moleculares con diferentes niveles de resolución taxonómica, que recomendamos para el análisis de poblaciones bacterianas cuyo tamaño de muestra es grande.

Después del aislamiento de las bacterias de los nódulos, lo primero que hicimos fueron *fingerprints* genómicos utilizando *primers* (véase el capítulo 17 de este libro) con afinidad por secuencias palindrómicas repetidas dispersas en el genoma de las bacterias, conocidos como Rep-PCR (de Bruijn, 1992). Esos *fingerprints* tienen un elevado nivel de resolución para identificar clonas -bacterias genómicamente idénticas-, pero no tiene resolución en niveles taxonómicos superiores. A partir de la identificación de aislados pertenecientes a una misma clona, se seleccionaron aislados representativos de la variación genética para el siguiente análisis de tipificación. El análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP; véase el capítulo 18 de este libro) de amplificaciones del gen que codifica para la 16S rARN y del espaciador intergénico (ITS) 16S-23S rADN mostró que la mayoría de los aislados forman un grupo independiente, para el cual no existían cepas o especies descritas, cercano al grupo formado por aislados caracterizados como *B. japonicum* (Vinuesa *et al.*, 1998, 1999).

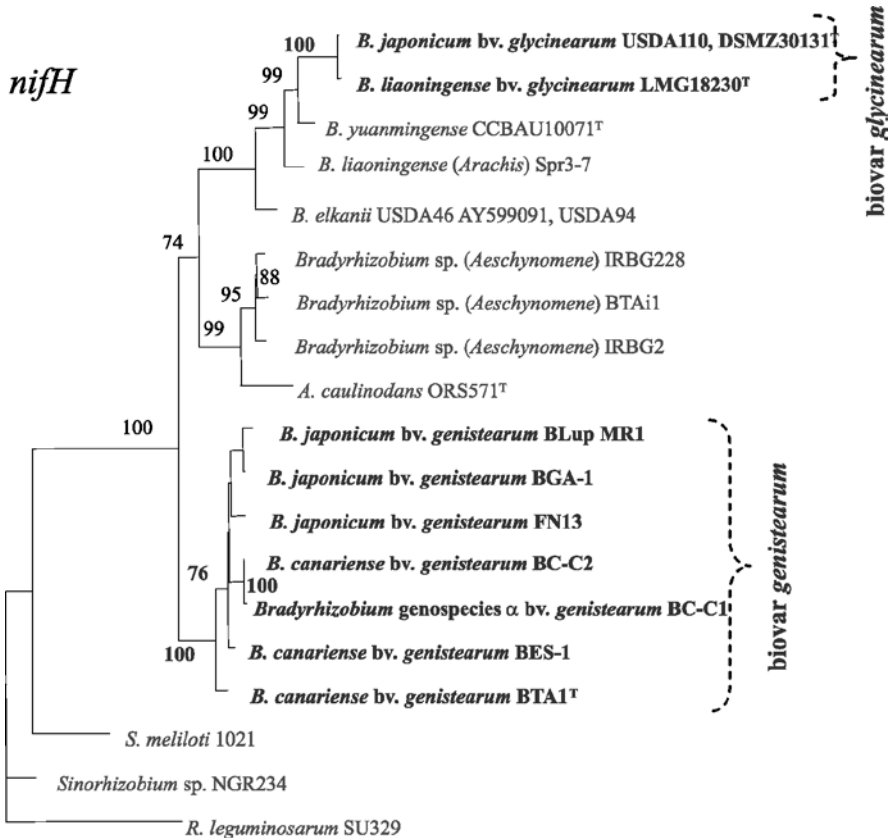
Otros aislados de Canarias mostraron RFLPs idénticos a los de *B. japonicum* y un aislado tuvo un patrón diferente a los dos anteriores. Estos resultados dieron los primeros indicios de que la mayoría de los aislados (70% de los nódulos) pertenecían a una nueva especie, que recientemente describimos como *B. canariense* (Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005c). Experimentos de nodulación mostraron que los aislados de las leguminosas genistoides eran incapaces de

nodular soya (*Glycine* spp.) y que las cepas aisladas de soya (como *B. japonicum* y *B. elkanii*) eran incapaces de nodular a las leguminosas genistoides, lo cual dio los primeros indicios de que los aislados de Canarias representaban una nueva biovariedad o ecotipo nodulador (Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005c).

Las electroforesis de enzimas (MLEE) fueron el siguiente marcador molecular que analizamos para conocer la dinámica poblacional de *B. canariense*. Los análisis de genética de poblaciones mostraron que no existe diferenciación genética significativa entre las poblaciones insulares y continentales de *B. canariense*, sugiriendo la existencia de flujo genético entre ellas. Los análisis de desequilibrio de ligamiento (véase el capítulo 9 de este libro) mostraron equilibrio para la población de *B. canariense* y desequilibrio al analizarla junto con los aislados de *B. japonicum*, indicando la posible existencia de una barrera al intercambio genético entre estas dos especies simpátricas (Vinuesa *et al.*, 2005c). Los marcadores moleculares que han aportado la información concluyente sobre el estatus taxonómico y evolutivo de estas bacterias han sido las secuencias nucleotídicas de cuatro loci involucrados en el mantenimiento celular (*atpD*, *glnII*, *recA* e ITS 16S-23S rADN) y dos genes involucrados en la simbiosis (*nifH* y *nodC*). Los análisis filogenéticos basados en los genes de mantenimiento muestran que entre los aislados de las leguminosas genistoides hay cuatro linajes principales: la nueva especie que describimos *B. canariense*, la especie descrita *B. japonicum*, y dos linajes referidos como las genoespecies α y β (Vinuesa y Silva 2004; Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005c). Estos linajes forman grupos monofiléticos son un alto soporte en las filogenias de los genes individuales como en la filogenia de especies generada a partir de las secuencias congruentes concatenadas *glnII+recA*.

Por otro lado, las filogenias derivadas de los dos genes involucrados en la simbiosis forman un grupo monofilético para los aislados de los cuatro linajes cromosomales (figura 5). Este resultado evidencia eventos de transferencia lateral de loci simbióticos entre fondos cromosomales pertenecientes a linajes divergentes. A esta nueva biovariedad noduladora de leguminosas genistoides la hemos nombrado *genistearum* (Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005c). Los análisis de genética de poblaciones basados en las secuencias de los loci de mantenimiento refuerzan las conclusiones derivadas del análisis de isoenzimas, mostrando nula diferenciación entre las poblaciones de *B. canariense* insulares y continentales, una muy significativa diferenciación entre las poblaciones simpátricas de *B. canariense* y *B. japonicum*, y recombinación significativa entre los miembros de cada población, pero no entre especies. Este último resultado fue también evidenciado con un análisis de *split decomposition* (Huson, 1998;

Figura 5. Filogenia de máxima verosimilitud para secuencias *nifH* de *Bradyrhizobium*. En los nodos se muestran los valores de bootstrap > 70%. Con base en la correlación entre clados *nifH* y especificidad por hospederos se proponen por primera vez dos biovariedades para el género *Bradyrhizobium*: la biovariedad *glycinearum* de aislados asociados a soya y la biovariedad *genistearum* asociada a leguminosas genistoides. Figura publicada en el estudio de Vinuesa *et al.* (2005a).

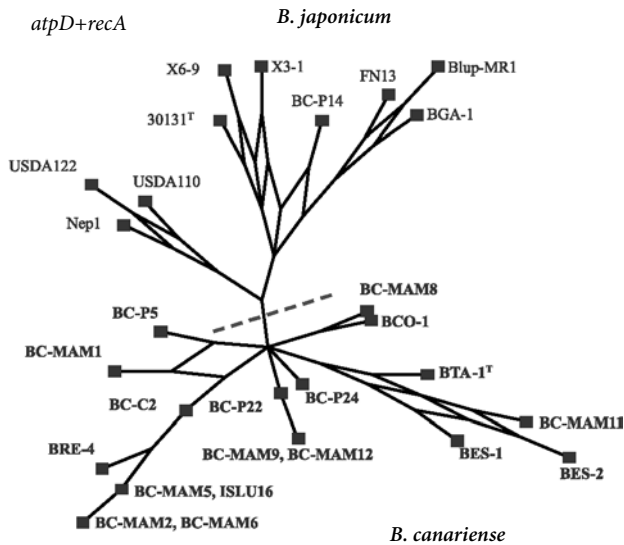


0.1 substituciones / sitio

véase también el artículo 4 de este libro)) que mostró evolución reticulada dentro de las poblaciones pero no entre especies (figura 6).

El conjunto de resultados muestran que la migración y la recombinación son importantes fuerzas de cohesión genética que mantienen la identidad de

Figura 6. Análisis de *split decomposition* para las secuencias concatenadas *atpD* y *recA*. En la gráfica se observan los patrones de evolución reticulada dentro de las poblaciones de *B. canariense* y *B. japonicum*. Sin embargo, no se observa ningún indicio de reticulación que involucre a las dos especies. Nótese que la gráfica está representada con vértices iguales (no proporcionales a la distancia genética). La línea punteada indica la rama más larga cuando la gráfica se hace proporcional a la distancia genética. Tomado de Vinuesa *et al.* (2005c).



las especies; existe una barrera para el intercambio genético de genes de mantenimiento entre especies simpátricas, y que, sin embargo, la transferencia lateral de genes simbióticos entre especies ha ocurrido. La distribución geográfica de *B. canariense* bv. *genistearum* y *B. japonicum* bv. *genistearum* incluye a las Islas Canarias y áreas continentales cercanas, Norteamérica y probablemente se extiende a otras regiones (Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 2005c). Creemos que estas bacterias pueden estar siendo transportadas junto con las partículas de polvo que surgen de África y son llevadas por las corrientes atmosféricas a diferentes partes del mundo (Griffin *et al.*, 2002; Prospero, 2004).

CONCLUSIONES

Todo parece indicar que los genomas bacterianos evolucionan por módulos: genes organizados en operones, cromosomas con regiones variables móviles

(casetes o islas) y arquitecturas genómicas compuestas por varios replicones (cromosomas y plásmidos). Esto produce genomas mosaico, con unidades intercambiables que pueden estar o no presentes en los diferentes individuos de una misma especie (Lan y Reeves, 2000). Además del recambio de información genética entre individuos de una especie, la transferencia lateral de información genética entre individuos de especies, géneros o incluso dominios diferentes está ampliamente documentada, en particular para genes que confieren fuertes ventajas selectivas.

La mayoría de los estudios sobre evolución bacteriana ha analizado poblaciones de bacterias patógenas de humanos. En nuestra opinión el estudio de los rizobios ha ampliado la perspectiva acerca de la evolución bacteriana. Dado que la mayor parte del ciclo de vida de los rizobios ocurre en el suelo y que sólo una fracción de los individuos de las poblaciones entra en simbiosis, podemos estudiar diversos aspectos del efecto selectivo del hospedero sobre el genoma accesorio de los rizobios y la evolución del genoma central de una bacteria de vida libre. La ganancia o la pérdida de información simbiótica produce ecotipos con la capacidad de ocupar nichos específicos (los nódulos de una leguminosa particular) y dentro de una especie pueden existir diferentes ecotipos a la vez. La información simbiótica puede ser transferida entre individuos de una especie o incluso géneros o familias diferentes.

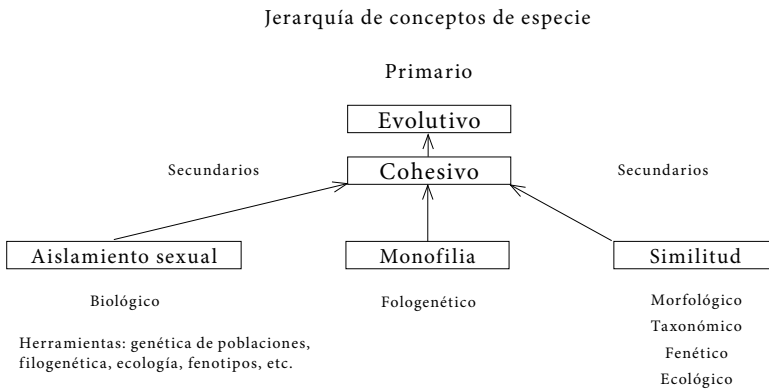
Del estudio de los rizobios nos queda una visión de las especies bacterianas como entidades cohesivas donde la recombinación homóloga dentro de las poblaciones, la migración y el flujo génico juegan papeles importantes, incluso en la escala global. El examen de las comunidades microbianas asociadas a las partículas de polvo transportadas entre continentes por tormentas originadas en Asia y África parecen estrategias prometedoras para descubrir las vías de dispersión de los rizobios, como ya se ha documentado para otras bacterias y hongos del suelo (Griffin *et al.*, 2002; Prospero, 2004).

En nuestra experiencia la delimitación de especies bacterianas debe partir de un buen muestreo de poblaciones, así como de un esquema jerárquico de análisis de la variación genética donde se utilicen diferentes marcadores moleculares y fenotípicos que permitan conocer la variación de loci de mantenimiento y adaptativos, combinando análisis filogenéticos y de genética de poblaciones para resolver problemas interrelacionados sobre ecología evolutiva y sistemática bacteriana. Aunque el gen *rrs* (16S rARN) es el marcador genético más utilizado, cada vez queda más claro que por su frecuencia de recombinación y número variable de copias por genoma, no es el locus más adecuado para estudios filogenéticos y ecológicos. Es preferible analizar genes

de mantenimiento que codifican para proteínas, ya que contienen mayor información y existen más herramientas para analizar sus procesos de evolución molecular (véase el capítulo 1 en este libro).

Los métodos clásicos utilizados en la delimitación de especies bacterianas son útiles para evaluar la similitud entre cepas, pero no es válido imponer puntos de corte arbitrarios para delimitar especies. Creemos que el concepto de especie evolutivo es el que mejor puede manejar la enorme diversidad del mundo vivo (figura 7). Este concepto tiene la capacidad de incluir el conocimiento que tenemos sobre la ecología y evolución bacteriana, en particular, el papel fundamental del intercambio genético dentro y entre especies. Tenemos que aceptar que las especies no son estáticas ni sistemas cerrados. Es importante incorporar el pensamiento poblacional a la sistemática bacteriana para poder estudiar en un marco más amplio la variación genética, las relaciones filogenéticas y los caracteres y mecanismos ecológicos que dan cohesión a las especies.

Figura 7. Se plantea que el concepto evolutivo de especie sea el concepto primario y que los demás conceptos de especie (basados en los criterios de similitud, monofilia y aislamiento sexual) se utilicen como conceptos secundarios para aportar información que sustente al concepto evolutivo. Se propone que las mejores herramientas para buscar las fuerzas de cohesión y delinear a las especies son la genética de poblaciones y la filogenética, así como estudios ecológicos y fenotípicos. Adaptado de Mayden (1997)



BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R., y Kuhl, M. 1998. *In situ* methods for assessment of microorganisms y their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:352-358.
- Amann, R. I., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification y *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Amarger, N., Macheret, V., y Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. y *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:996-1006.
- Asai, T., Zaporozhets, D., Squires, C., y Squires, C. L. 1999. An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rARN operons inactivated: complete exchange of rARN genes between bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1971-1976.
- Brewin, N. J. 1998. Tissue y cell invasion by *Rhizobium*: the structure y development of infection threads y symbiosomes. Pages 417-429 in: *The Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Brochier, C., Philippe, H., y Moreira, D. 2000. The evolutionary history of ribosomal protein RpS14: horizontal gene transfer at the heart of the ribosome. *Trends Genet.* 16:529-533.
- Brockwell, J., Bottomley, P. J., y Thies, J. E. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity y soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174:143-180.
- Brom, S., Girard, L., García-de los Santos, A., Sanjuan-Pinilla, J. M., Olivares, J., y Sanjuan, J. 2002. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2555-2561.
- Brown, E. W., Kotewicz, M. L., y Cebula, T. A. 2002. Detection of recombination among *Salmonella enterica* strains using the incongruence length difference test. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24:102-120.
- Chen, W.-M., Laevens, S., Lee, T.-M., Coenye, T., de Vos, P., Mergeay, M., y Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species y sputum of cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1729-1735.
- Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., y Boivin-Masson, C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185:7266-7272.
- Cheng, T. C. 1991. Is parasitism symbiosis? A definition of terms y the evolution of concepts. Pages 15-36 in: *Parasite host associations. Coexistence or conflict?* C. A. Tof, A. Aeschlimann, y L. Bolis (eds.). Oxford University Press, Oxford.

- Claridge, M. F., Dawah, H. A., y Wilson, M. R. 1997. Species: the units of biodiversity, Chapman y Hall, London.
- Cohan, F. M. 1994a. The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary divergence in prokaryotes. *Am. Nat.* 143:965-986.
- Cohan, F. M. 1994b. Genetic exchange y evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 9:175-180.
- Cohan, F. M. 1996. The role of genetic exchange in bacterial evolution. *ASM News* 62:631-636.
- Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56:457-487.
- Daubin, V., Moran, N. A., y Ochman, H. 2003. Phylogenetics y the cohesion of bacterial genomes. *Science* 301.
- de Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic y enterobacterial intergeneric consensus) sequences y the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates y other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.
- Doolittle, R. F. 2002. Microbial genomes multiply. *Nature* 416:697-700.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., Anderson, K. L., y Alberro, M. R. 1990. A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. *J. Mol. Evol.* 31:383-388.
- Dowson, C. G., Hutchison, A., Brannigan, J. A., George, R. C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J. M., y Spratt, B. G. 1989. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8842-6.
- Dykhuizen, D. E., y Green, L. 1991. Recombination in *Escherichia coli* y the definition of biological species. *J. Bacteriol.* 173:7257-7268.
- Dykhuizen, D. E., Polin, D. S., Dunn, J. J., Wilske, B., Preac-Musric, V., y Dattwyler, R. J. 1992. *Borrelia burgdorferi* is clonal: implications for taxonomy y vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10162-10167.
- Eardly, B. D., Wang, F.-S., y van Berkum, P. 1996. Corresponding 16S rARN gene segments in Rhizobiaceae y *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil* 186:69-74.
- Feil, E. J., y Spratt, B. G. 2001. Recombination y the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:561-590.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., y Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* y legumes. *Nature* 387:394-401.
- Freiberg, C., Perret, X., Broughton, W. J., y Rosenthal, A. 1996. Sequencing the 500-kb GC-rich symbiotic replicon of *Rhizobium* sp. NGR234 using dye terminators y a thermostable "sequenase": a beginning. *Genome. Res.* 6:590-600.

- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., HeARNdez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., y Batut, J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293:668-672.
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F., y Lawrence, J. G. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19:2226-2238.
- Gogarten, J. P., Murphey, R. D., y Olendzenski, L. 1999. Horizontal gene transfer: pitfalls y promises. *Biol. Bull.* 196:359-362.
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M. A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Hernández-Celis, J. C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodríguez, O., Flores, M., Cevallos, M. A., Collado-Vides, J., Romero, D., y Dávila, G. 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 y its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome. Biol.* 4:R36.
- Gordon, D. M., Wexler, M., Reardon, T. B., y Murphy, P. J. 1995. The genetic structure of *Rhizobium* populations. *Soil Biology y Biochemistry* 27:491-499.
- Graham, P. H., y Vance, C. P. 2003. Legumes:Importance y constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131:872-877.
- Griffin, D. W., Kellogg, C. A., Garrison, V. H., y Shinn, E. A. 2002. The global transport of dust - An intercontinental river of dust, microorganisms y toxic chemicals flows through the Earth's atmosphere. *Am. Sci.* 90:228-235.
- Hashimoto, J. G., Stevenson, B. S., y Schmidt, T. M. 2003. Rates y consequences of recombination between rARN operons. *J. Bacteriol.* 185:966-972.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., y Kolsto. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2627-2630.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., y Sanjuan, J. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:87-97.

- Holmes, E. C., Urwin, R., y Maiden, M. C. 1999. The influence of recombination on the population structure y evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* 16:741-749.
- Hooykaas, P. J., Snijdewint, F. G., y Schilperoort, R. A. 1982. Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 y its transfer to y expression in other rhizobia y *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 8:73-82.
- Hooykaas, P. J. J., Klapwijk, P. M., Nuti, M. P., Schilperoort, R. A., y Rorsch, A. 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid to avirulent agrobacteria y to *Rhizobium ex planta*. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.
- Hooykaas, P. J. J., y Schilperoort, R. A. 1984. The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Adv. Genet.* 22:209-283.
- Hull, D. L. 1997. The ideal species concept -y why we can't get it. Pages in:Species: the units of biodiversity. M. F. Claridge, H. A. Dawah, y M. R. Wilson (eds.). Chapman y Hall, London.
- Huson, D. H. 1998. SplitsTree:analyzing y visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14:68-73.
- Jain, R., Rivera, M. C., y Lake, J. A. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3801-3806.
- Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Donate-Correa, J., Rivas, R., Velázquez, E., Hernández, M., Temprano, F., Martínez-Molina, E., Ruiz-Argüeso, T., y León-Barrios, M. 2003. Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. y *Ornithopus* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:611-623.
- Jarabo-Lorenzo, A., Velazquez, E., Perez-Galdona, R., Vega-HeARNdez, M. C., Martinez-Molina, E., Mateos, P. E., Vinuesa, P., Martinez-Romero, E., y Leon-Barrios, M. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rADN y low molecular weight ARN profiling of rhizobial isolates from shrubby legumes endemic to the Canary islands. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:418-425.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., y Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *ADN Res.* 7:331-338.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., y Tabata, S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *ADN Res.* 9:189-197.

- Kaplan, L., y Lynch, T. F. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radio-carbon dates y their significance for pre-Columbian agriculture. *Econ. Bot.* 53:261-272.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S. I., Rodríguez Casartelli, R., y Amarger, N. 1992. Conformity y diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, y bv. *phaseoli* revealed by ADN hybridization using chromosome y plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* 39:412-419.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., y Amarger, N. 2001. Clasificación of rhizobia based on *nodC* y *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147:981-993.
- Lan, R., y Reeves, P. 2001. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends Microbiol.* 9:419-424.
- Lan, R., y Reeves, P. R. 1998. Recombination between rARN operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 144:1213-1221.
- Lan, R. T., y Reeves, P. R. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol.* 8:396-401.
- Lawrence, J. G. 1999. Gene transfer, speciation, y the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:519-523.
- Lawrence, J. G. 2000. Clustering of antibiotic resistance genes: beyond the selfish operon. *ASM News* 66:281-286.
- Lawrence, J. G. 2002. Gene transfer in bacteria: speciation without species? *Theor. Popul. Biol.* 61:449-460.
- Lawrence, J. G., y Hendrickson, H. 2003. Lateral gene transfer: when will adolescence end? *Mol. Microbiol.* 50:739-749.
- Lawrence, J. G., y Roth, J. R. 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* 143:1843-1860.
- Levin, B. R., y Bergstrom, C. T. 2000. Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, y opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6981-6985.
- Li, W.-H. 1997. *Molecular evolution*, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts.
- Long, S. R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56:203-214.
- Louvrier, P., Laguerre, G., y Amarger, N. 1996. Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4202-4205.
- Ludwig, W., y Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S y 23S rARN sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:155-173.

- Madigan, M. T., Martiniko, J. M., y Parker, J. 2000. Brock biology of microorganisms, Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Maggi Solcà, N., BeARNsconi, M. V., Valsangiacomo, C., Van Doorn, L. J., y Piffaretti, J. C. 2001. Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analysed by sequencing of four housekeeping genes (*atpD*, *glnA*, *scoB* y *recA*), y by *vacA*, *cagA*, *iceA* y *IS605* genotyping. *Microbiology* 147:1693-1707.
- Majewski, J. 2001. Sexual isolation in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199:161-169.
- Martínez, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* 161:11-20.
- Martínez, E., Palacios, R., y Sanchez, F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169:2828-2834.
- Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S., y Collins, M. D. 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* y *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal ADN sequencing: lack of congruence with results of ADN-ADN hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:412-421.
- Martínez-Romero, E. 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview y perspectives. *Plant Soil* 252:11-23.
- Matic, I., Taddei, F., y Radman, M. 1996. Genetic barriers among bacteria. *Trends Microbiol.* 4:69-72.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Pages in: Species: the units of biodiversity. M. F. Claridge, H. A. Dawah, y M. R. Wilson (eds.). Chapman y Hall, London.
- Maynard Smith, J. 1995. Do bacteria have population genetics? Pages 1-12 in: Population genetics of bacteria. E. A. Boumberg (ed.) Cambridge University Press.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M., y Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4384-4388.
- Mayr, E. 1970. Populations, species, y evolution, Belknap Press of Harvard University, Massachusetts.
- Mhamdi, R., Jebara, M., Aouani, M. E., Ghrir, R., y Mars, M. 1999. Genotypic diversity y symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. *Biol. Fertil. Soils* 28:313-320.
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., y Amarger, N. 2002. Different species y symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:77-84.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., y Boivin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950.

- Mylvaganam, S., y Dennis, P. P. 1992. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rARN from the halophilic archaebacterium *Haloaccula marismortui*. *Genetics* 130:399-410.
- Nei, M., y Kumar, S. 2000. Molecular evolution y phylogenetics, Oxford University Press, New York.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., Fraser, C. M., y et al. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea y bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399:323-329.
- Parker, M. A. 2001. Case of localized recombination in 23S rARN genes from divergent bradyrhizobium lineages associated with neotropical legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2076-2082.
- Pérez-Ramírez, N. O., Rogel, M. A., Wang, E., Castellanos, J. Z., y Martínez-Romero, E. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:289-296.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamouisis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A., y Blattner, F. R. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-533.
- Prospero, J. M. 2004. Intercontinental transport of viable fungi y bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. Pages in: Biological Resources y Migration. D. Werner (ed.). Springer Verlag, Berlin.
- Pupo, G. M., Lan, R., y Reeves, P. R. 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* y convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10567-10572.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Buendía, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M., y Santamaría, C. 2000. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biol. Biochem.* 32:1601-1613.
- Rogel, M. A., Hernández-Lucas, I., Kuykendall, L. D., Balkwill, D. L., y Martínez Romero, E. 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adherence* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3264-3268.
- Romero, D., y Brom, S. 2004. The symbiotic plasmids of the *Rhizobiaceae*. En: Plasmid Biology. B. E. Funnell y G. J. Philips (eds.). ASM press, Washington. Páginas 271-290.

- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Reeves, M. W., Mayer, L. W., y Popovic, T. 2002. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rARN genes y use of 16S rARN gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J. Clin. Microbiol.* 40:4520-4527.
- Sadowsky, M. J., y Graham, P. H. 1998. Soil biology of the *Rhizobiaceae*. En: The *Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Páginas 155-172.
- Sadowsky, M. J., y Graham, P. H. 2002. The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer Verlag.
- Sakar, S. F., y Guttman, D. S. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1999-2012.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M., y Li, L. Y. 1995. Conjugative transposons: an unusual y diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59:579-590.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., y Young, J. M. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49:155-179.
- Schofield, P. R., Gibson, A. H., Dudman, W. F., y Watson, J. M. 1987. Evidence for genetic exchange y recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmid in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2942-2947.
- Schouls, L. M., Schot, C. S., y Jacobs, J. A. 2003. Horizontal transfer of segments of the 16S rARN genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J. Bacteriol.* 185:7241-7246.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R., y Martínez-Romero, E. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426-433.
- Segovia, L., Young, J. P., y Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., Akkermans, A. D. L., y de Vos, W. M. 1997a. Characterization of *Rhizobium etli* y other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Mol. Ecol.* 6:601-608.
- Sessitsch, A., Ramírez-Saad, H., Hardarson, G., Akkermans, A. D., y de Vos, W. M. 1997b. Classification of Austrian rhizobia y the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1097-1101.
- Silva, C., Eguiarte, L. E., y Souza, V. 1999. Reticulated y epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.* 8:277-287.

- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E., y Souza, V. 2003. *Rhizobium etli* y *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics y biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:884-893.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Souza, V., y Martínez-Romero, E. 2005. Evolutionary genetics y biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol. Ecol.* 14: 4033-4050.
- Singh, S. P., Gepts, P., y Debouck, D. G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45:379-396.
- Sivakumaran, S., Lockhart, P. J., y Jarvis, B. D. 1997. Identification of soil bacteria expressing a symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trofolii*. *Can. J. Microbiol.* 43:164-177.
- Smith, M. W., Feng, D. F., y Doolittle, R. F. 1992. Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem. Sci.* 17:489-493.
- Snyder, L., y Champness, W. 1997. Molecular genetics of bacteria, ASM Press, Washington, D. C.
- Soberón-Chavez, G., y Nájera, R. 1988. Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information. *Can. J. Microbiol.* 35:464-468.
- Souza, V., Bain, J., Silva, C., Bouchet, V., Valera, A., Márquez, E., y Eguiarte, L. E. 1997. Ethnomicrobiology: Do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*? *J. Ethnobiol.* 17:249-266.
- Souza, V., Nguyen, T. T., Hudson, R. R., Piñero, D., y Lenski, R. E. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8389-8393.
- Spaink, H. P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P. J. J. 1998. The Rhizobiaceae, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Spratt, B. G., y Maiden, M. C. 1999. Bacterial population genetics, evolution y epidemiology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354:701-710.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfner, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., y Whitman, W. B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047.
- Stackebrandt, E., y Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for ADN-ADN reassociation y 16S rARN sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.

- Sullivan, J. T., B. D. Eardly, P. van Berkum y C.W. Ronson. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2818-2825.
- Sullivan, J. T., H. N. Patrick, W. L. Lowther, D. B. Scott y C. W. Ronson. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal y symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8995-8999.
- Sullivan, J. T., y Ronson, C. W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis isly that integrates into a phe-tARN gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5145-5149.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., y Dreyfus, B. 2001. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate y fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183:214-220.
- Tan, Z. Y., Kan, F. L., Peng, G. X., Wang, E. T., Reinhold-Hurek, B., y Chen, W. X. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid y semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:909-914.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species y speciation: A genetic perspective. En: Speciation y its consequences. D. Otte y J. A. Endler (eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts. Páginas 3-27.
- Terefework, Z., Nick, G., Suomalainen, S., Paulin, L., y Lindstrom, K. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia y agrobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 2:349-356.
- Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Julliot, J.-S., Camut, S., y J., D. 1984. Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: Host-specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.* 157:134-142.
- Turner, S. L., y Young, J. P. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics y evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* 17:309-319.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., y Matsuguchi, T. 1995. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. *J. Bacteriol.* 177:468-472.
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A., y Eardly, B. D. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate y form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:13-22.
- van Berkum, P., y Eardly, B. D. 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. Pages 1-24 in: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria*. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindstrom, K., y Eardly, B. D. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of Rhizobia. *J. Bacteriol.* 185:2988-2998.
- van Rhijn, P., y Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., y Martínez-Romero, E. 2005a. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies α y *Bradyrhizobium* genospecies β . *International Journal of Syst. Evol. Microbiol.* 55:569-575.
- Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., de Bruijn, F. J., y Werner, D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rARN (16S rADN) y 16S-23S rADN intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting y partial 16S rADN sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2096-2104.
- Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., de Bruijn, F. J., y Werner, D. 1999. Characterization of *Bradyrhizobium* spp. strains by RFLP analysis of amplified 16S rADN y rADN intergenic spacer regions. Pages 275-279 in: Highlights on Nitrogen Fixation. E. Martínez y G. Hernández (eds.). Plenum Publishing Corporation, New York.
- Vinuesa, P., y Silva, C. 2004. Species delineation y biogeography of symbiotic bacteria associated with cultivated y wild legumes. En: Biological Resources y Migration. D. Werner, ed. Springer Verlag, Berlin. Pp. 143-155.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J., y Martínez-Romero, E. 2005b. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood y Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* y *nifH* sequences, y their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 702-716.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., y Martínez-Romero, E. 2005c. Population genetics y phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration y recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion y delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34:29-54.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., y Radman, M. 1997. Molecular keys to speciation: ADN polymorphism y the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9763-9767.

- Wang, E. T., Rogel, M. A., García-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A., y Martínez-Romero, E. 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1479-1491.
- Ward, D. M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:271-277.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletie, D. A., y Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal ADN amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., PeARN, N. T., Mobley, H. L., Donnenberg, M. S., y Blattner, F. R. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:17020-17024.
- Wernegreen, J., y Riley, M. A. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic y housekeeping loci: A case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Biol. Evol.* 16:98-113.
- Wernegreen, J. J., Harding, E. E., y Riley, M. A. 1997. *Rhizobium* gone native: Unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5483-5488.
- Willems, A., y Collins, M. D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia y agrobacteria based on 16S rARN gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:305-313.
- Woese, C. R. 2002. On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:8742-8747.
- Woese, C. R., Kandler, O., y Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, y Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4576-4579.
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G. E., Almeida, N. F., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Karp, P. D., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M. J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z. Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S. V., Tomb, J. F., Gordon, M. P., Olson, M. V., y Nester, E. W. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294:2317-2323.
- Yap, W. H., Zhang, Z., y Wang, Y. 1999. Distinct types of rARN operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* y evidence for horizontal transfer of an entire rARN operon. *J. Bacteriol.* 181:5201-5209.

- Young, J. P. W. 1993. Molecular phylogeny of rhizobia y their relatives. En: New horizons in nitrogen fixation. P. R., J. Mora, y W. E. Newton, (eds.). Kluwer Academic Publishers, London. Páginas 587-592.
- Young, J. P. W., y Haukka, K. 1996. Diversity y phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133:87-94.
- Young, J. P. W., y Johnston, A. W. B. 1989. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* 4:341-349.
- Young, J. P. W., y Wexler, M. 1988. Sym plasmid y chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2731-2739.