

## DIVERSIDAD GENÉTICA DE BACTERIAS MUTUALISTAS DE PLANTAS

Martínez-Romero, E.<sup>1</sup>; Lloret, L.<sup>1</sup>; Ormeño-Orrillo, E.<sup>1</sup>; Vinuesa, P.<sup>1</sup>;  
Rosenblueth, M.<sup>1</sup>; Rincón, R.<sup>2</sup>; Rogel, M.A.<sup>1</sup>; Silva, C.<sup>1</sup>;  
Martínez-Romero, J.<sup>1</sup>; Toledo, I.<sup>1</sup>; López, A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

México es un país con una gran diversidad vegetal, animal y también microbiana. Esta última es muchas veces olvidada o desdeñada pero es esencial para la supervivencia de todas las demás especies. Ha sido gracias a los nuevos enfoques moleculares que se ha podido revelar una diversidad bacteriana insospechada y se han clasificado certeramente a las bacterias. Algunas de las bacterias contribuyen al crecimiento de las plantas y de estas bacterias hemos reconocido algunas nuevas especies. En el estudio de las bacterias endófitas (en el interior) de plantas como plátano, caña de azúcar y maíz identificamos una nueva especie de *Klebsiella*, muy cercana a *K. pneumoniae*. A esta nueva especie la nombramos *K. variicola*, que significa de muchos sitios porque se obtuvo de una amplia variedad de plantas pero también de pacientes humanos en hospitales pediátricos. No recomendamos su uso en agricultura a pesar de que estas bacterias promueven el crecimiento vegetal y son fijadoras de nitrógeno. *Rhizobium* y bacterias de géneros relacionados son capaces de formar nódulos (pequeñas biofábricas de fertilizante nitrogenado) en las raíces de las plantas leguminosas, como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) o árboles de leguminosas como *Leucaena*, *Sesbania* o *Acacia*. Algunas especies de estos géneros son nativas de México y sus simbiontes no habían sido caracterizados. Reconocimos entre ellos nuevas especies, como *Rhizobium etli*, *R. tropici* y *Sinorhizobium americanum*, que han sido de utilidad tanto para estudios moleculares como para aplicaciones en agricultura o en proyectos de recuperación ecológica en áreas taladas. El uso de estas bacterias sustituye a los fertilizantes químicos nitrogenados y permite a las plantas crecer en suelos pobres de nitrógeno. Por otro lado, el reconocimiento adecuado de las especies nos ha permitido revelar que con la tala de los bosques de los Tuxtlas en México se pierden especies de *Bradyrhizobium* nativas de la selva. Existe aún un gran desconocimiento de las especies de bacterias asociadas a plantas.

**PALABRAS CLAVE:** agricultura, filogenias, *Klebsiella*, leguminosas, *Rhizobium*.

### SUMMARY

## GENETIC DIVERSITY OF MUTUALISTIC BACTERIA FROM PLANTS

Mexico is a country with a large diversity of plants, animals and bacteria. Bacterial diversity is not always considered in biodiversity studies but it is key to the survival of all other species. Molecular approaches have revealed an enormous and unsuspected bacterial diversity and have allowed an accurate classification of bacteria. We have discovered some new species among bacteria that promote plant growth. Studying endophytic (inside plants) bacteria from banana, sugarcane and maize, we identified a new *Klebsiella* species, closely related to *K. pneumoniae*. We named this new species *K. variicola*, meaning "different places" because it was isolated from a large variety of plants and also from human patients in pediatric hospitals. Even though these bacteria promote plant growth and fix nitrogen, we do not recommend their use in agricultural fields. *Rhizobium* and bacteria from related genera are nitrogen fixing bacteria that form nodules (small biological factories of N fertilizers) in the roots of legumes such as *Phaseolus vulgaris* (beans) or trees like *Leucaena*, *Sesbania* and

<sup>1</sup>Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México. <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.  
E-mail: emartine@ccg.unam.mx

*Acacia*. Some species of these genera are native to Mexico and their symbionts had not been previously analyzed. We discovered new species as *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici* and *Sinorhizobium americanum*, that have become useful not only for molecular studies but also for applications in agriculture or in reforestation projects in tilled areas. The use of these bacteria substitutes chemical nitrogen fertilizers and allows plants to grow in nitrogen poor soils. The adequate identification of species has allowed us to reveal that the tillage of Tuxtla forest in Mexico causes loss of *Bradyrhizobium* species native to the forest. There is still an enormous lack of knowledge of bacterial species associated with plants.

**KEY WORDS:** agriculture, *Klebsiella*, legumes, phylogenies, *Rhizobium*.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas surgieron entre el sol y el suelo con sus microorganismos. En el suelo se encuentra una de las diversidades más altas de bacterias, entre  $10^4$ - $10^5$  o más especies diferentes por gramo de suelo con  $10^{12}$  bacterias totales por gramo. Seguramente plantas y microorganismos han coevolucionado durante cientos de millones de años. Las relaciones que se establecieron entre plantas y bacterias son de lo más diversas, destacándose las interacciones mutualistas y las patogénicas.

El objetivo de este trabajo es la descripción de la diversidad genética de bacterias benéficas de plantas que han sido estudiadas en nuestro laboratorio. Se incluirán tanto bacterias que son endofíticas (dentro de las plantas) como aquellas capaces de formar nódulos en las raíces de plantas como las leguminosas.

### Endófitos

La caña de azúcar en Brasil (Boddey *et al.*, 1995) parece obtener un aporte significativo de nitrógeno que proviene de bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de convertir el N gaseoso de la atmósfera en amonio, el cual es utilizado por las plantas. Del interior de plantas de caña de azúcar de Brasil se han aislado diferentes especies de bacterias (James & Olivares, 1997; James *et al.* 1997, Olivares *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 1994). En México aislamos cepas de la especie *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de caña de azúcar que se encontraban en campos agrícolas donde no se utilizan altas concentraciones de fertilizantes nitrogenados (Caballero Mellado y Martínez-Romero, 1994). La diversidad genética de estas bacterias fue más reducida que la encontrada en Brasil (Caballero-Mellado *et al.*, 1995) en donde se emplean normalmente bajas cantidades de fertilizantes nitrogenados. Encontramos también que la colonización de estas bacterias en el invernadero se ve disminuida cuando las plantas crecen en presencia de fertilizantes nitrogenados (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999). Un efecto similar del fertilizante sobre la colonización de bacterias fijadoras de nitrógeno se demostró posteriormente en arroz (Tan *et al.*, 2003). Encontramos

*Gluconacetobacter diazotrophicus* y una nueva especie de *Gluconacetobacter* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001) asociadas también con café, pero en la rizósfera principalmente. Investigadores en un laboratorio de E. E. U. U. reportaron que *G. diazotrophicus* es capaz de proporcionar N a plántulas de caña de azúcar y promover su crecimiento (Sevilla *et al.*, 2001), tal vez por su capacidad de producir hormonas vegetales.

Del interior de diferentes tejidos de la planta de plátano aislamos diversas bacterias fijadoras de nitrógeno que promueven el crecimiento de las plantas generadas a partir de cultivos de tejidos. La bacteria más abundante en condiciones cultivables fue *Enterobacter* (Martínez *et al.*, 2003). Los estudios filogenéticos que hemos realizado con estas bacterias indican que se trata de un nuevo género cercano a *Enterobacter* (Rosenblueth *et al.*, no publicado). Además aislamos un grupo considerable de bacterias pertenecientes al género *Klebsiella*. Estas bacterias fueron aisladas también de plantas de maíz, de caña de azúcar y de arroz. Sorprendentemente, las bacterias de *Klebsiella* obtenidas de las plantas fueron indistinguibles de bacterias aisladas en hospitales pediátricos de pacientes humanos enfermos. Estas bacterias se aíslan con menor frecuencia de casos clínicos que *Klebsiella pneumoniae* y representan una nueva especie, a la que nombramos *K. variicola* (Rosenblueth *et al.*, 2004), cercanamente relacionada con *K. pneumoniae*. No recomendamos su uso en agricultura (Lloret *et al.*, 2004) ya que pensamos que los contagios humanos provienen de reservorios naturales como las plantas (Martínez *et al.*, 2004). Las bacterias de *K. variicola* de pacientes fueron todas fijadoras de nitrógeno y poseen niveles más bajos de resistencia a antibióticos que las cepas clínicas de *K. pneumoniae* (Rosenblueth *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004).

En la agricultura tradicional en México y en Perú se cultiva el frijol asociado al maíz. Supusimos que en estas condiciones las bacterias podrían compartirse entre ambas plantas, por lo que buscamos cepas de *Rhizobium etli* (que es el simbionte más común de frijol que forma nódulos fijadores de N) en las plantas de maíz. En cultivos en asociación todas las plantas de maíz contenían *R. etli*, mien-

tras que en monocultivos de maíz sólo un porcentaje bajo (20%) tenían *R. etli* (Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001). En la rizósfera del maíz encontramos  $10^{6-8}$  bacterias de *R. etli* por gramo seco de suelo y  $10^{3-4}$  por gramo de tejido fresco de raíz en el interior como endófitos. Las bacterias aisladas de maíz son capaces de re-colonizar un gran número de razas y variedades criollas de maíz y también de promover su crecimiento (Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001). El análisis mediante patrones de movilidad electroforética de enzimas metabólicas y perfiles de plásmidos de poblaciones de *R. etli* de diferentes nichos: suelo, nódulos, rizósfera y del interior de raíces y tallos, reveló una diferenciación de las poblaciones (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2004), lo que sugirió que existen clonas más adaptadas para colonizar el interior de la planta de maíz. Actualmente estamos estudiando las diferencias en el contenido genómico de una cepa de *R. etli* que es muy buena colonizadora de maíz en comparación con una cepa de *R. etli* que no coloniza eficientemente. Además, estudiamos los genes de *R. etli* que se expresan en presencia de maíz (Rosenblueth *et al.*, no publicado). *Rhizobium* se ha utilizado en la agricultura por más de 100 años y no se considera que represente un riesgo para la salud. Dada la gran capacidad competitiva de algunas cepas de *R. etli* para colonizar maíz, éstas se pudieron utilizar para desplazar poblaciones de bacterias de *Burkholderia cepacia* que colonizan maíz en Europa (Chiarini *et al.*, 2000). Las cepas de *B. cepacia* se consideran un riesgo para la salud humana ya que causan infecciones (aun letales) en pacientes con fibrosis quística.

### Bacterias nodulantes

Las leguminosas constituyen una de las familias más grandes de plantas. Tal vez parte de su éxito se debe a su capacidad de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. Una revisión de las poblaciones de rizobios nativos de México se publicó recientemente (Martínez-Romero, 2001). En México existe un gran número de leguminosas nativas, entre ellas destacan las plantas del género *Phaseolus* (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y otras 47 especies). *P. vulgaris*, el frijol común, fue domesticado en Mesoamérica y en otros dos sitios en Sudamérica (Gepts & Debouck, 1991). Las especies que se aíslan principalmente de los nódulos de frijol son *Rhizobium etli* en México (Piñero *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1991, 1993; Silva *et al.*, 2003) y *R. tropici* en suelos ácidos en Sudamérica (Martínez-Romero *et al.*, 1991), aunque también hemos aislado *R. gallicum* bv. *gallicum* (Silva *et al.*, 2005), el cual es también simbionte de *P. coccineus*. En contraste, *P. lunatus*, el frijol Lima, establece simbiosis con diferentes linajes de

*Bradyrhizobium* (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2005), algunos de crecimiento extra lento y con *Bradyrhizobium yuanningense* (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2005; Vinuesa *et al.*, 2005b), además hemos encontrado un nuevo linaje que representa una nueva especie de *Bradyrhizobium* (Ormeño-Orrillo *et al.*, no publicado).

Uno de los géneros más amplios de leguminosas es el de las acacias. Las acacias son altamente resistentes a la sequía con raíces que llegan a 35 m de profundidad y son noduladas por varias especies de rizobios (de Lajudie *et al.*, 1994; 1998; Nick *et al.*, 1999). Describimos una nueva especie de *Sinorhizobium*, *S. americanum*, aislada de los nódulos de varias especies de acacias nativas de México (Toledo *et al.*, 2003). *S. americanum* está cercanamente relacionado a *S. fredii* que nodula soya en China. *S. americanum* no nodula soya y *S. fredii* no nodula *Acacia*, lo que indica que hay una co-evolución de estas bacterias con sus hospederos. De otra especie de *Acacia*, *A. angustissima* que crece en las selvas de Chiapas y de Morelos hemos aislado y estamos caracterizando un nuevo linaje de sinorhizobia, cercanamente relacionado con *S. terangaie*, que es simbionte de diferentes especies de *Acacia* en África.

En los nódulos de *Sesbania* en México encontramos *R. huautlense* que es capaz de nodular en condiciones de inundación (Wang *et al.*, 1998). En campos inundados en Venezuela también encontramos *R. huautlense* en otras especies de *Sesbania* (Vinuesa *et al.*, 2005a).

De la selva tropical de los Tuxtlas en Veracruz hemos reconocido linajes nuevos de *Bradyrhizobium*, uno de los cuales se pierde con el cambio de uso de suelo, que ocasiona también otros cambios drásticos en las poblaciones de rizobios (Ormeño-Orrillo *et al.*, enviado). El conocimiento que hemos obtenido de los simbiontes de diversos árboles de leguminosas incluyendo *Acacia* (Toledo *et al.*, 2003), *Gliciridia* (Acosta *et al.*, 2002) y *Leucaena* (Wang *et al.*, 1999) nos ha permitido iniciar proyectos de restauración ecológica en los que introducimos leguminosas nativas y sus bacterias en áreas taladas.

La identificación y las relaciones entre las bacterias las hemos establecido con base en estudios filogenéticos considerando las secuencias de genes que codifican proteínas y también de los genes ribosomales. Estos enfoques moleculares han permitido revelar la gran diversidad genética de bacterias asociadas a plantas y su más certera identificación (Vinuesa *et al.*, 2005b). La diversidad de bacterias asociadas a plantas aún está poco explorada y seguramente tiene una función ecológica y agronómica muy importante. La utilización de *Rhizobium* como inoculante en la agricultura permite ahorros de millones de dólares (Mendes *et al.*, 2004).

## AGRADECIMIENTOS

Financiamiento para estos trabajos se obtuvo del CONACyT No. 40997-Q y de DGAPA (PAPIIT) IN205802-3. Se tuvo apoyo técnico de Edith Ponce, Aryana Chávez, Saraí García Oliván y Lucero Jaimez García.

## BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA-DURÁN, C. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2002. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. Arch. Microbiol. 178:161-164.
- BODDEY, R. M., DE OLIVEIRA, O. C., URQUIAGA, S., REIS, V. M., OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil 174:195-209.
- CABALLERO MELLADO, J., FUENTES RAMÍREZ, L. E., REIS, V. M. & MARTÍNEZ ROMERO, E. 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. Appl. Environ. Microbiol. 61:3008-3013.
- CABALLERO MELLADO, J. & MARTÍNEZ ROMERO, E. 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Environ. Microbiol. 60:1532-1537.
- CHIARINI, L., GIOVANNELLI, V., BEVIVINO, A., DALMASTRI, C. & TABACCHIONI, S. 2000. Different portions of the maize root system host *Burkholderia cepacia* populations with different degrees of genetic polymorphism. Environ. Microbiol. 2:111-118.
- DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOREIRA, F., MOLOUBA, F., HOSTE, B., TORCK, U., NEYRA, M., COLLINS, MD., LINDSTROM, K., DREYFUS, B. & GILLIS, M. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 2:369-382.
- DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., COLLINS, MD., DREYFUS, B., KERSTERS, K. & GILLIS, M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:715-733.
- FUENTES-RAMÍREZ, L. E., BUSTILLOS-CRISTALES, R., TAPIA-HERNÁNDEZ, A., JIMÉNEZ-SALGADO, T., WANG, E. T., MARTÍNEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johanna* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1305-1314.
- FUENTES-RAMÍREZ, L. E., CABALLERO-MELLADO, J., SEPÚLVEDA, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiol. Ecol. 29:117-128.
- GEPTS, P. & DEBOUCK, D. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: van Schoonhoven, A.; Voyses, O. (Eds.). Common Beans: Research for Crop Improvement. C.A.B. Int, Wallingford-UK and CIAT, Cali, Colombia, p.7-53.
- GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). J. Biotechnol. 91:117-126.
- JAMES, E. K. & OLIVARES, F. B. 1997. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant Sci. 17:77-119.
- JAMES, E. K., OLIVARES, F. L., BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J. Exp. Bot. 48:785-797.
- LLORET, L., ROSENBLUETH, M., TOLEDO, I. & MARTÍNEZ ROMERO, E. 2004. Ecología bacteriana. Beneficios y riesgos del uso agrícola de rizobios y klebsiellas. Scientific American Latinoamérica 3:34-35.
- MARTÍNEZ, L., CABALLERO, J., OROZCO, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2003. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). Plant Soil 257:35-47.
- MARTÍNEZ, J., MARTÍNEZ, L., ROSENBLUETH, M., SILVA, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. Int. Microbiol. 7:261-268.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2001. Poblaciones de rhizobia nativas de México. Acta Zool. Mex. (n.s.) 1:29-38.
- MARTÍNEZ ROMERO, E., SEGOVIA, L., MERCANTE, F. M., FRANCO, A. A., GRAHAM, P. & PARDO, M. A. 1991. *Rhizobium tropici*: a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:417-426.
- MENDES, I. C., HUNGRIA, M. & VARGAS, M. A. T. 2004. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. Biol. Fertil. Soils 40:28-35.
- NICK, G., DE LAJUDIE, P., EARDLY, B.D., SUOMALAINEN, S., PAULIN, L., ZHANG, X., GILLIS, M. & LINDSTROM, K. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostense* sp. nov., isolated

- from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1359-1368.
- OLIVARES, F. L., JAMES, E. K., BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.* 135:723-737.
- ORMEÑO-ORRILLO, E., VINUESA, P., ZÚÑIGA-DÁVILA, D. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Syst. Appl. Microbiol.* In Press.
- PIÑERO, D., MARTÍNEZ, E. & SELANDER, R. K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
- REIS, V. M., OLIVARES, F. L. & DÖBEREINER, J. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:401-405.
- ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ, L., SILVA, J. and MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:27-35.
- ROSENBLUETH, M. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181:337-344.
- SEGOVIA, L., PIÑERO, D., PALACIOS, R. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426-433.
- SEGOVIA, L., YOUNG, P. W. & 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.
- SEVILLA, M., BURRIS, R. H., GUNAPALA, N. & KENNEDY, C. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutants strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:358-366.
- SILVA, C., VINUESA, P., EGUIARTE, L. E., MARTÍNEZ-ROMERO, E. & SOUSA, V. 2003. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:884-893.
- SILVA, C., VINUESA, P., EGUIARTE, L. E., SOUZA, V. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol. Ecol.* in press.
- TAN, Z., HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* 5:1009-1015.
- TOLEDO, I., LLORET, L. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:54-64.
- VINUESA, P., SILVA, C., LORITE, M. J., IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L., BEDMAR, E. J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005a. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *System. Appl. Microbiol.* 27: in press.
- VINUESA, P., SILVA, C., WERNER, D. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005b. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34:29-54.
- WANG, E. T., MARTÍNEZ-ROMERO, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 1999. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Mol. Ecol.* 8:711-724.
- WANG, E.T., VAN BERKUM, P., BEYENE, D., SUI, X.H., DORADO, O., CHEN, W.X. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galagae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4:687-699.