

## Taxonomía de *Rhizobium*

**En Tao Wang<sup>1</sup>, Julio Martínez-Romero<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. <sup>2</sup> Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México

### Taxonomía de los rizobios

A partir de un nódulo de raíz de leguminosa en 1888 Beijerinck obtuvo por primera vez un cultivo bacteriano puro y llamó a la bacteria *Bacillus radicola*. Posteriormente, Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Debido a que los aislados bacterianos eran diferentes según el huésped específico del que se obtenían, para 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. En esta clasificación, cada especie era un grupo que se componía de cepas que nodulaban a un conjunto de leguminosas huésped. Trabajos posteriores desafiaron esta designación de especies que estaba basada en la especificidad del huésped. En 1944 Wilson reportó un gran número de nodulaciones que cruzaban las fronteras de las diferentes especies. En 1964 Graham y en 1968 Moffett y Colwell sugirieron modificar la taxonomía y basarse en resultados de la taxonomía numérica. Más tarde, en 1974, Jordan y Allen dividieron las seis especies en dos grupos (Tabla 1) de acuerdo con sus tasas de crecimiento, flagelos y reacciones ácidos/alcalinas en medio YMA (Extracto de levadura, 0.4 g; Manitol, 10.0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro; pH 7.0-7.2). Además de estas seis especies, se incluyó un grupo misceláneo designado *Rhizobium* spp. Después de más investigación de taxonomía usando los métodos de biología molecular (como hibridación ADN-ADN y rRNA-ADN) y los de método tradicionales, Jordan (10) cambió la taxonomía de rizobio. En su sistema se dividieron los rizobios en dos géneros: *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. El género *Bradyrhizobium*, que correspondía al grupo II de Jordan y Allen, incluye las cepas de lento crecimiento, productoras alcalinas en YMA que tienen las colonias ≤ 1 mm en diámetro a los 5-7 días en placas de YMA. En este género se designó una sola especie, *B. japonicum*, que incluyó también la especie anterior *R. lupini* porque las cepas de *Lupinus* fueron muy similares a las de soya en taxonomía numérica y en hibridación ADN-ADN. En el género *Rhizobium*, se incluyeron tres especies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* y *R. loti*. *R. leguminosarum* incluye tres biovars: bv. *viciae* que antes era la especie *R. leguminosarum*; bv. *phaseoli* que anteriormente era *R. phaseoli*; y bv. *trifolii* que fue la anterior *R. trifolii*. Las tres biovars constituyen el mismo grupo en taxonomía numérica y en hibridación ADN-ADN, pero corresponden a diferentes grupos de nodulación cruzada.

Actualmente la taxonomía de los rizobios se desarrolla rápidamente y durante los últimos 20 años se han descrito muchas especies y géneros nuevos. La aplicación de los métodos de biología molecular en la taxonomía ha ayudado a definir los nuevos rizobios. La taxonomía actual de los rizobios se base en un enfoque polifásico (7) que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras. El uso del enfoque polifásico ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable. Se estima que los rizobios no-conocidos en el mundo

representan un recurso biológico porque las leguminosas son uno de los grupos de plantas más grande y diverso y éstas se encuentran distribuidas en distintos ecosistemas. Sólo se han investigado los microsimbiontes de un pequeño número de ellas. Seguramente nuevos rizobios se conocerán cuando se caractericen más aislados.

De acuerdo con una definición operativa de especie en bacteriología, cada especie bacteriana consta de un grupo de cepas que comparten características que las distinguen como grupo de otras especies bacterianas. El uso de técnicas de biología molecular ha provisto de una descripción más precisa para las especies. El análisis de secuencias de los genes 16S rRNA se ha usado como uno de los principales criterios para la descripción de los géneros y las especies de rizobios (**Fig. 2**). Se considera que las cepas cuyas secuencias del gen de 16S rRNA son similares en un 97% o más, probablemente pertenecen a la misma especie. Si bien se puede distinguir a los diferentes géneros de rizobios a partir del parecido de las secuencias de genes de 16 rRNA, sin embargo no hay un porcentaje definido para marcar las fronteras entre géneros. Por otra parte, cuando las secuencias de 16S RNA son muy parecidas, este criterio no permite distinguir especies cercanamente relacionadas y esto ocurre debido a que el gen 16S rRNA está muy conservado entre todos los organismos vivos. En la taxonomía de *Rhizobium* para definir las especies dentro de cada género se han utilizado varios métodos entre ellos la hibridación de ADN-ADN.

Para definir a las especies bacterianas se ha utilizado estimar el parecido entre secuencias de ADN a partir de la hibridación ADN-ADN. Esta técnica se basa en que la doble hélice del ADN puede desnaturalizarse en altas temperaturas y reasociarse en bajas temperaturas y es una técnica especialmente útil cuando las secuencias de genes 16S rRNA se parecen en más del 97%. La cantidad de ADN reasociado o la tasa de reasociación se relaciona con la homología de las secuencias de ADN. Se sugiere que las cepas que muestran una similitud  $\geq 70\%$  en la hibridación de ADN-ADN son de misma especie. Cepas que comparten un parecido de ADN-ADN entre 25 y 60% pueden representar diferentes especies dentro del mismo género. Si el parecido es menor a 10% se considera que pertenecen a diferentes géneros. La mayor parte de las especies rizobianas definidas cumplen con este criterio. Son excepciones a esta regla: *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium tropici* y *Mesorhizobium plurifarium*. En cada uno de estas tres especies se incluyen cepas o grupos que comparten menos de un 70% de parecido de ADN-ADN. En estos casos, es necesario incluir otros métodos como electroforesis (SDS-PAGE) de proteínas, electroforesis de enzimas metabólicas (o enzimas multilocus) (MLEE) y otros, para definir todas las especies descritas.

En la definición de las especies de rizobios también se ha utilizado el análisis de enzimas metabólicas, por ejemplo en los casos de *Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. huautlense*, y *Mesorhizobium amorphae*. La distancia genética (determinada a partir de la proporción de alelos enzimáticos con diferente movilidad en electroforesis) de 0.5 se consideró como uno de los criterios para definir a dichas especies. Valores de distancia genética menores que 0.5 se encuentran entre cepas dentro de una misma especie, por ejemplo en *R. leguminosarum*, y mayores que 0.5 entre diferentes especies dentro del género *Mesorhizobium*. El análisis MLEE provee información acerca de la variación genética en una especie, de tal información se puede estimar la estructura genética en las poblaciones naturales y de este modo se puede valorar el papel evolutivo de la selección Darwiniana, deriva aleatoria, mutación e intercambio horizontal de genes. Selander y colaboradores en 1986 resumieron los métodos de este análisis. Los rizobios parecen

tener una estructura de población clonal con escasa recombinación genética entre poblaciones distantes; sin embargo, hay datos que indican la existencia de la transferencia genética entre poblaciones locales.

El análisis de proteínas totales en electroforesis en una dimensión permite agrupar a los rizobios con base en las similitudes de los patrones. Generalmente, los grupos definidos por electroforesis de proteínas están relacionados con aquellos que se pueden distinguir por su similaridad de ADN-ADN o por patrones de enzimas metabólicas.

Con la reacción de la polimerasa de ADN en cadena (PCR) usando iniciadores de oligonucleótidos dirigidos a distintas secuencias se pueden generar patrones de fragmentos de ADN, dichos patrones se llaman huellas digitales del ADN. Estos métodos se usan tanto para investigar la diversidad genética dentro de las poblaciones de rizobios como para agrupar las cepas bacterianas y se basan en la variación genética en las secuencias blanco localizadas en los genomas que sirven para anclar a los iniciadores. Los productos sintetizados por la reacción de PCR se separan por electroforesis con base en su tamaño molecular y su secuencia de nucleótidos. Los iniciadores comunes usados en la caracterización de bacterias son los de las secuencias "BOX" (BOX-PCR), los que pegan al azar al cromosoma (RAPD-PCR), los que sirven para las secuencias repetidas extragénicas palindrómicas (REP-PCR), los de secuencias intergénicas repetidas enterobacterianas o secuencias consensos intergénicas repetidas de enterobacterias.

La determinación de polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción (RFLP) es otro método para revelar la diversidad genética entre grupos de cepas bacterianas. Este análisis incluye la digestión del ADN total, la separación del ADN digerido por electroforesis y la hibridación de los patrones de restricción con un detector específico de un gen o unos genes. También se pueden digerir productos sintetizados por PCR y analizar los RFLP directamente por electroforesis. Así se pueden caracterizar a los genes 16S rRNA amplificados por PCR o ADN del espacio intergénico (IGS).

En la descripción del fenotipo de las bacterias se reportan las características de morfología celular y colonial, bioquímicas y fisiológicas, los patrones de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, los patrones de resistencia a antibióticos, y otras como huéspedes o ambientes de donde se obtiene la bacteria. El cúmulo de estos datos se evalúan por un análisis de agrupamiento, la llamada taxonomía numérica. Las características fenotípicas pueden ofrecer una visión detallada de la variación de las bacterias dentro de una especie o entre diferentes especies. También permite reconocer rasgos característicos de cada especie.

La descripción del rango de huéspedes también se incluye en la definición taxonómica de los rizobios. Algunos rizobios tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otros. Se ha reportado que *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium fredii* son capaces de nodular un gran número de leguminosas. Mientras que *S. meliloti* ha sido aislado principalmente de las plantas del géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Tregonella*. En muchos casos se usan los resultados de nodulación en laboratorio para describir el rango de huéspedes, aunque las condiciones en laboratorio son muy diferentes que las que se encuentran en campo. Algunos rizobios son capaces de nodular unas especies de leguminosas en laboratorio, a pesar de que no se haya aislado a esos

rizobios a partir de esas plantas en campo; por ejemplo, en laboratorio se observó la nodulación de *Leucaena leucocephala* por *R. huautlense* y de frijol por *M. plurifarium* pero no en campo. La asociación entre los rizobios y las leguminosas en la naturaleza puede tener una gran importancia ecológica.

Hasta la fecha, se han escrito más de 40 especies en 9 géneros para las bacterias que forman nódulos con leguminosas (Fig. 2, Tabla 2). Todas ellas son bacilos aeróbicos Gram-negativos en el phylum BXII, *Proteobacteria* (8). Las células tienen formas irregulares (curvas, en forma de X o de Y, llamadas bacteroides) dentro de los nódulos. Los bacteroides son las formas diferenciadas que fijan nitrógeno. Normalmente los bacteroides completamente desarrollados ya no pueden volver a reproducirse, aunque existe controversia al respecto. Se ha reportado que los rizobios tienen tres diferentes estados de vida: uno dentro de los nódulos de las leguminosas, otro en suelo y otro dentro de plantas no leguminosas como endófitos. Todos los rizobios pueden vivir muy bien como saprófitos en los suelos o en medios de cultivo. Algunos aislados pueden ser obtenidos independientes de plantas en suelos químicamente contaminados. Como endófitos, los rizobios han sido aislados de diferentes plantas. Por ejemplo, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y cepas fotosintéticas de *Bradyrhizobium* se ha encontrado en raíces de arroz y *R. etli* en raíces de maíz. Pueden también introducirse y colonizar otras plantas, tal como sucede con *Azorhizobium caulinodans* en las raíces de la oleaginosa *Brassica napus*. Estas asociaciones entre rizobios y plantas no leguminosas pueden mejorar el crecimiento de las plantas aunque no se ha demostrado que sea mediante la fijación de nitrógeno.

En este sistema, la definición de género y unidades taxonómicas más altas se basan en la filogenia de los genes de 16S rRNA (Fig. 1). Con base en las secuencias de genes de 16S rRNA, todos los rizobios son miembros del phylum *Proteobacteria*, pero en diferentes clases y ordenes. La mayor parte de los rizobios son de orden VI, Rhizobiales, de la clase I, *Alfaproteobacteria*. En este orden, los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* se incluyen en la familia *Rhizobiaceae*. *Mesorhizobium* está en la familia *Phyllobacteriaceae*. *Bradyrhizobium* y *Blastobacter* están en la familia *Bradyrhizobiaceae*. *Azorhizobium* y *Devosia* se incluyen en la familia *Hyphomicrobiaceae*. En el mismo orden, también se encuentran bacterias formadoras de nódulos en *Methylobacterium* de la familia *Methylobacteriaceae*. Solo dos grupos bacterianos en la clase II, *Betaproteobacteria*, incluyen bacterias que forman nódulos con las leguminosas. Ellas son *Burkholderia* spp. y *Ralstonia taiwanensis* en el orden *Burkholderiales*. Aunque estas bacterias tienen muy diversas relaciones filogenéticas al comparar a los genes 16S rRNA, se encontró una gran similitud entre las secuencias de sus genes simbióticos, como *nif* y *nod*, indicando que transferencias horizontales de los genes simbióticos ocurrieron en la naturaleza entre ellas, como se ha descrito en especies de *Mesorhizobium* (18). Este evento es importante para la evolución de los rizobios, porque cada género tiene vecinos no simbióticos que tienen el potencial de recibir los genes simbióticos desde los rizobios. Los rizobios de los géneros *Rhizobium* y *Allorhizobium* forman un grupo polifilético junto con las especies de *Agrobacterium*. En el género *Sinorhizobium*, se incluyen dos especies no simbióticas, *S. morelense* (23) y *S. adhaerens* (26). Las especies de *Mesorhizobium* son muy cercanas a *Aminobacter*. Las especies de *Bradyrhizobium* tienen relaciones cercanas a *Afipia*. La transferencia lateral de genes simbióticos se ha hecho evidente en el campo (18) y se ha realizado en laboratorio. Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium morelense* y *S.*

*adhaerens* pueden formar nódulos efectivos (que fijan nitrógeno) en las leguminosas cuando reciben los genes simbióticos. Todos estos datos indican que los rizobios y sus vecinos filogenéticos tenían orígenes comunes. Se puede suponer que nuevos linajes de rizobios sigan emergiendo todavía en la naturaleza debido a la transferencia de los genes simbióticos y al hecho de que bacterias no simbióticas, relacionadas con rizobios, pueden convertirse en bacterias formadoras de nódulos eficientes tanto en condiciones de laboratorio como de campo.

Si bien los géneros de rizobios se definen con base en la filogenia de los genes 16S rRNA, cada género tiene otras características distintivas. El género *Azorhizobium* contiene cepas que forman nódulos de tallos y de raíces y fijan nitrógeno en condiciones de vida libre y simbiótica. Las cepas de *Bradyrhizobium* crecen lentamente (colonias de menos de 1 mm de diámetro después de 7 días de incubación) y producen álcali en medio YMA. El género *Mesorhizobium* incluye cepas con crecimiento lento o moderado (colonias de 1-2 mm después de 5 a 7 días de incubación) y producen ácido en medio YMA. Los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* son bacterias que crecen rápido (colonias > 2 mm después de 3 a 5 días de incubación) y producen ácido en medio YMA.

Por otra parte, la definición de géneros es un problema actual en taxonomía. Aunque la definición de género se basa principalmente en la filogenia del gen 16S rRNA, no existe un estándar filogenético oficial para definir género. Este caso ha llevado a decisiones conflictivas tales como en el caso de la sugerencia de combinar los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium* (28). La combinación de *Agrobacterium* y *Rhizobium* ha sido causa de una gran discusión y algunos autores quieren mantenerlos en géneros separados (6). Se necesitan criterios taxonómicos estándar para definir géneros en el futuro. Otro problema en taxonomía bacteriana es que los métodos utilizados en diferentes trabajos de investigación sobre la taxonomía no son uniformes. Por ejemplo, para las primeras especies descritas se cuentan con información fenotípica acerca de su morfología celular, flagelos, requerimientos de factores de crecimiento, rango de pH y de temperatura para crecer, tolerancia a NaCl, resistencia a antibióticos, entre otros datos. Estos datos normalmente no están completos en las especies descritas recientemente.

A continuación se presentan las descripciones de los géneros de rizobios con base en el sistema presentado en la edición 2 del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (8).

**Género *Allorhizobium*** (13). Este género se incluye en la segunda edición de “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (11) y contiene solo una especie, *A. undicola*. Se trata de bacilos Gram negativos de  $0.5\text{-}0.7 \times 2.0\text{-}4.0$  V. variable, que forman colonias de 0.5-3.0 mm de diámetro después de 1-2 días de incubación en YMA. *A. undicola* es un rizobio de rápido crecimiento que produce ácido y polisacáridos extracelulares en YMA. Se mueve en medio líquido. Fue aislado originalmente de los nódulos de la raíz de una planta acuática, *Neptunia natans*, que crece en África. Invade las raíces por el daño causado por la germinación de raíces nuevas y forma nódulos en la base de las raíces laterales y adventicias. Esta bacteria nodula *Medicago sativa*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal*, *Acacia tortilis*, *Lotus arabicus*, y *Faidherbia albida* (11). *A. undicola* forma una rama larga más cercana a las especies de *Agrobacterium* en el árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias de genes de 16S rRNA. Por

eso, se sugirió combinar este género en *Rhizobium*, juntos con las especies de *Agrobacterium* (28).

**Género *Azorhizobium*** (5). Son bacilos de  $0.5-0.6 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$ . Se mueven en medio semisólido gracias a flagelos peritricos y en medio líquido con flagelo lateral. Las colonias son circulares translúcidas, gomosas y tienen un color cremoso. Crece tan rápido como *Rhizobium* (las colonias miden más de 2 mm de diámetro después de 2 días de incubación), pero produce álcali como *Bradyrhizobium* en YMA. Crece mejor con ácidos orgánicos como fuente de carbono que usando carbohidratos (excepto glucosa). Fija  $\text{N}_2$  en vida libre bajo condiciones microaeróbicas y en simbiosis. Hay una sola especie descrita en este género, *A. caulinodans*. Esta bacteria fue aislada de nódulos de los tallos de *Sesbania rostrata* que crece en Senegal. También puede formar nódulos en las raíces de la planta huésped. La especie *A. caulinodans* tiene muchas características que la diferencian de otros grupos rizobianos. La capacidad de nodular los tallos de *Sesbania* y de fijar nitrógeno tanto en vida libre como en condiciones simbióticas son características únicas de esta especie. Esta bacteria invade las raíces de *Sesbania* entrando por grietas de las raíces laterales, que son fisuras epidérmicas normales que se forman alrededor de raíces laterales emergentes. Esta ruta de invasión es similar a la de *Allorhizobium*, pero diferente a las de los otros rizobios que entran a las raíces a través de procesos de infección altamente especializados que involucran la presencia de hilos de infección. *A. caulinodans* ha sido usada como bacteria promotora del crecimiento del arroz y se investigan los mecanismos que permiten su penetración en las raíces del arroz. No se encuentran plásmidos simbióticos en este género y se estima que los genes simbióticos están localizados en el cromosoma. En el árbol filogenético de los rizobios forma una rama distantemente relacionada con los otros rizobios pero cercana a las especies de *Xanthomonas* y *Aquabacter* (similitud del 98.2% de las secuencias de genes de 16S rRNA). Por esta razón y considerando que sus características relacionadas con la fijación de nitrógeno en vida libre así como la organización de los genes *nod* y la forma de invadir al huésped, se piensa que tal vez *Azorhizobium* podría haber evolucionado de una bacteria diazotrófica de la filósfera (de las hojas) a una simbiótica adquiriendo genes *nod* por transferencia horizontal.

**Género *Bradyrhizobium*** (10). Estas bacterias son bacilos de  $0.5-0.9 - 1.2-3.0 \mu\text{m}$ . Se mueven con un flagelo polar o subpolar. Este género consiste de cepas de lento crecimiento, productoras de álcali. Las colonias son circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas con un diámetro menor a 1 mm después de 5-7 días de incubación. Han sido descritas cuatro especies dentro este género con base en el análisis polifásico incluyendo caracterización fenotípica, hibridación de ADN-ADN, polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de genes de 16S rRNA amplificados por PCR, nodulación con plantas selectivas, etc. Excepto *B. yuanmingense*, otras tres especies en este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular a la soya (*Glycine max*). *B. yuanmingense* nodula a *Lespedeza cuneata*, pero no a la soya (27). *B. japonicum* tiene un amplio rango de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas. Algunas cepas fijan nitrógeno en vida libre bajo ciertas circunstancias. *B. elkanii* se distingue de *B. japonicum* por diferencias en sus secuencias de ADN, en los patrones de enzimas metabólicas y de exopolisacáridos, en su contenido de ácidos grasos y hemoproteínas al igual que por diferencias en sus patrones de resistencia a antibióticos. El tiempo de generación de estas dos especies es de 8 horas o más. Las

especies *B. liaoningense* y *B. yuanmingense* son más cercanas a *B. japonicum* que a *B. elkanii* en el árbol filogenético (Fig. 1). Las cepas de *B. liaoningense* crecen muy lento y tienen tiempo de generación de 16.4 a 39.6 h. *B. yuanmingense* fue la única especie en este género que no noduló la soya. Las características diferentes entre estas especies se presentan en la Tabla 3. Se han obtenido también muchos aislados de *Bradyrhizobium* de varias leguminosas pero no se ha definido la especie a la que corresponden. Algunos rizobios fotosintéticos de nódulos de tallos de la leguminosa acuática *Aeschynomene* han sido identificados como miembros de *Bradyrhizobium*, cercanos o distintos a las especies descritas (1, 14). De las especies descritas, ninguna tiene plásmidos simbióticos y los genes simbióticos están localizados en el cromosoma. Se ha reportado que existe sólo un operón del gen ribosomal en *Bradyrhizobium*.

**Género *Mesorhizobium* (9).** Las bacterias de este género son bacilos que miden  $0.4-0.9 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$ . Generalmente son pleomórficas en condiciones adversas de crecimiento, tales como alta concentración de sales y en los nódulos. Se han reportado flagelos peritricos o un flagelo polar o subpolar. Las colonias en YMA son circulares, convexas, semitranslúcidas y mucilaginosas, miden 2-4 mm de diámetro después de 5 días de incubación a 28 °C de algunas especies o menos de 1 mm después de 7 días de incubación de otras (Tabla 4). Son bacterias quimio-organotróficas que usan como fuente de carbono y de energía muchos carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos. No utilizan ni celulosa ni almidón. Todas las cepas producen ácido en YMA. Forman nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de diferentes plantas leguminosas de regiones templadas, subtropicales y tropicales. Se separó a este género de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* debido a su posición filogenética única, su crecimiento lento o moderado y su producción de ácido. Hay ocho especies en este género: *M. loti* (especie tipo), *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum* y *M. tianshanense*. La especie tipo, *M. loti*, fue transferida del género *Rhizobium*. Entre las ocho especies, *M. amorphae* y *M. huakuii* tienen plásmido simbiótico y otras especies tienen los genes simbióticos en su cromosoma. En *M. loti*, se ha descrito un fragmento de ADN transferible al que se ha dado el nombre de isla simbiótica porque los genes simbióticos están localizados en él. Estas especies tienen normalmente dos operones ribosomales; sin embargo, en un aislado mexicano se encontró una sola copia del gen de 16S rRNA. También hay bacterias no simbióticas cercanas a *Mesorhizobium* con base en la secuencia de los genes de 16S rRNA, por ejemplo, los géneros *Aminobacter*, *Chelatobacter*, y *Phylobacterium* y unos grupos no clasificados.

**Género *Rhizobium* (Frank 1889).** Las bacterias en este género son bacilos que miden  $0.5-1.0 \times 1.3-3.0 \mu\text{m}$ . Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, concavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en YMA. El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de polisacárido extracelular. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas de este género

son bacterias de rápido crecimiento productoras de ácido en YMA. Hay 13 especies definidas: *R. leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. tropici* y *R. yanglingense*. Las características distintivas de estas especies se presentan en la Tabla 5. A pesar de que las diferencias de espectros de fuente de carbono y nitrógeno se usan para distinguir las especies dentro del género, en la Tabla 5 no se presenta esta información. Estas especies nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales. Forman un grupo polifilético en el árbol filogenético (Fig. 2). *R. giardinii* es una rama distantemente relacionada con las otras especies. *R. galegae*, *R. huautlense* y *R. loessense* forman una subrama que tiene una relación más cercana con las especies de *Agrobacterium* que con otras especies de *Rhizobium*. El resto de las especies y *Agrobacterium rhizogenes* forman un grupo. Las especies de *Rhizobium* tienen tres copias de los genes ribosomales y los plásmidos simbióticos son comunes en ellas. Sin embargo, el plásmido simbiótico (o parte de él, incluyendo genes simbióticos) puede integrarse en el cromosoma. En unas especies como *R. leguminosarum* y *R. etli* se encontraron cepas no simbióticas en suelo o en el laboratorio al eliminar los genes simbióticos. También las cepas no simbióticas de los rizobios o de *Agrobacterium* pueden formar nódulos fijadores de nitrógeno al adquirir plásmidos o genes simbióticos a partir de los rizobios simbióticos. Estos casos indican la capacidad de cambio entre las bacterias simbióticas y las no simbióticas al adquirir o perder genes. Entre las especies de *Rhizobium*, *R. etli* es importante en México, en particular, y en América Latina, en general, ya que esta especie predomina en los nódulos del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Se ha secuenciado completamente el plásmido simbiótico de la cepa tipo de *R. etli*, CFN42, y también todo el genoma. Debido a que las especies de *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Allorhizobium* se entremezclan, además de que no se distinguen por características fenotípicas, se ha propuesto combinar los tres géneros en uno solo como *Rhizobium* (28), lo cual ha sido causa de controversia (6).

**Género *Sinorhizobium*** (2, 12). Son bacilos que miden 0.5-1.0 × 1.2-3.0 µm. El nombre genérico *Sinorhizobium* fue propuesto por primera vez para designar a las bacterias de rápido crecimiento aisladas en China que nodulan a la soya. Posteriormente se separó este género de *Rhizobium* principalmente debido a las diferencias en las secuencias de genes de 16S rRNA sin embargo no hay características fenotípicas específicas conocidas que distingan estos dos géneros. Las especies en este género crecen rápidamente y producen ácido en medio YMA. Se han identificado tres copias del gen ribosomal en ellas. Plásmidos grandes y megaplásmidos (> 1000 kbp) son comunes en estas especies y los genes simbióticos están localizados en esos plásmidos. La especie tipo, *S. meliloti*, fue transferida del género *Rhizobium* y ha sido estudiada extensamente. En esta especie son comunes dos megaplásmidos, megaplásmido 1 (plásmido simbiótico) y megaplásmido 2 (plásmido Exo), con respectivos pesos moleculares de 1700 y 1400 kbp. En varios laboratorios se obtuvieron las secuencias completas del cromosoma y los megaplásmidos. Además de las especies tipo, hay otras ocho especies simbióticas dentro de este género, *S. arboris*, *S. fredii*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. sahelii*, *S. terangae*, y *S. xinjiangense*. Recientemente, se describieron dos especies no simbióticas en este género: *S. morelense* y *S. adhaerens* (anteriormente *Ensifer adhaerens*). Las dos especies son bacterias que se reproducen por gemación (duplicación por división binaria no igual). *S. morelense* se aisló de nódulos

de *Leucaena leucocephala* pero no forma nódulos, aunque puede estimular el crecimiento de la planta en experimentos de inoculación. Sin embargo, esta bacteria puede entrar en los nódulos cuando se inocula junto con las cepas simbióticas. La especie *S. adhaerens* se transfirió del género *Ensifer* que se aisló del suelo y es una bacteria depredadora que se alimenta de las bacterias Gram positivas, como *Micrococcus luteus*. *S. morelense* y *S. adhaerens* forman una subrama del género *Sinorhizobium* que tiene similitud de las secuencias de 16S rRNA de más de 98% con otras especies de *Sinorhizobium*. Las dos especies pueden formar nódulos después de adquirir el plásmido simbiótico de *R. huautlense* o *R. tropici* por conjugación.

Las diferencias entre estas especies se observan en los análisis filogenético de las secuencias de genes de 16S rRNA y otras secuencias de ADN, patrones de proteínas y enzimas, caracterización fenotípica y especificidad de huésped. Algunas características de estas especies se listan en la Tabla 6. Algunas cepas aisladas de *Leucaena leucocephala* en México o de otras plantas se identificaron como miembros de *Sinorhizobium*. Una de las más famosas entre todas es la cepa NGR234 que tiene un amplio espectro de huéspedes y de la que se ha secuenciado el plásmido simbiótico. Se ha descubierto que este plásmido tiene una estructura de mosaico parecida a algunas secuencias del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o a genes de otras bacterias. También se ha reportado que el plásmido simbiótico de NGR234 puede integrarse en un megaplásmido o dentro del cromosoma en condiciones de laboratorio.

**Otros géneros que contienen bacterias formadoras de nódulos.** En años recientes se ha encontrado que otras bacterias forman nódulos fijadores de nitrógeno con las leguminosas. Esas bacterias se clasificaban tradicionalmente como bacterias no simbióticas. *Blastobacter denitrificans* es una bacteria acuática que se reproduce por gemación. Esta bacteria tiene relación cercana a los rizobios del género *Bradyrhizobium*. Se encontraron genes de nodulación y de la nitrogenasa en esa bacteria y se ha observado nodulación en leguminosas (20). Bacterias de esta especie aisladas de muestras ambientales también pueden tener la capacidad de nodulación. Las bacterias cercanas a los rizobios tal vez tienen más potencial para nodular porque es más fácil la transferencia horizontal de los genes simbióticos entre bacterias cercanas. La descripción de formadoras de nódulos en el género *Devosia* puede ser evidencia de esto ya que en el árbol filogenético tienen relaciones cercanas a *Azorhizobium* (Fig. 1). Varias cepas de los nódulos de *Neptunia natans* se clasificaron como *Devosia* por sus secuencias del gen de 16S rRNA (16). La descripción de formadoras de nódulos en los géneros *Methylobacterium* (19) y *Burkholderia* (15) y en la especie *Ralstonia taiwanensis* (3) demuestran que la capacidad de nodulación se distribuye ampliamente entre las bacterias debido a la transferencia horizontal de los genes simbióticos. Por otro lado, las bacterias simbióticas de las plantas también pueden ser simbiosistas de la hormiga *Tetraponera* (21). En las hormigas se han encontrado bacterias fijadoras de nitrógeno relacionadas con *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* por PCR, amplificación y secuenciación.

## Bibliografía

1. Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Bâ, A., Gillis, M., de Lajudie, P. y Dreyfus, B. 2000. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl Environ Microbiol* **66**:5437-5447.
2. Chen, W. X., G. H. Yan y J. L. Li. 1988. Numeric taxonomic study of the fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**:392–397.
3. 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 and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1729-1735.
4. Chen, W. X., Wang, E. T. y Kuykendall L. D. 2003. Genus *Mesorhizobium*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. II. 2<sup>nd</sup> Edition. (En impreso)
5. Dreyfus, B., Garcia, J. L. y Gillis, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bacteriol* **38**:89-98.
6. Farrand, S. K., van Berkum, P. y Oger, P. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:1681-1687.
7. Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J. y Kersters K. 2001. Polyphasic Taxonomy. pp. 43-48. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> edición. Volume I. Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (eds.).
8. Garrity, G. M. y Holt, J. G. 2001. The road map to the manual. pp. 119-166. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> edición. Volume I. EditBoone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. (eds.).
9. Jarvis, B. D. W., van Berkum, P., Chen, W. X., y 4 autores más (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:895-898.
10. Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* **32**:136-139.
11. Kuykendall L. D. y Dazzo, F. B. 2003. Genus *Allorhizobium*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. II. 2<sup>nd</sup> Edition. (En prensa)
12. de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., y 7 autores más. (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.
13. de Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., y 6 autores más. (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* **48**:1277-1290.
14. Molouba, F., Lorquin, J., Willems, A., Hoste, B., Giraud, E., Dreyfus, B., Gillis, M., de Lajudie, P. y Masson-Boivin, C. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl Environ Microbiol* **65**:3084-3094.
15. 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.
16. Rivas, R., Velazquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B., y Martinez-Molina, E. 2002. A new species of *Devosia*

- that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* **68**:5217-5222.
17. Squartini, A., Struffi, P., Doring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velazquez, E., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S. y Nuti, M. P. 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1267-1276.
  18. Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., y Ronson, C. W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:8985-8989.
  19. Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., y Drefus, B. 2001. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* **183**:214-220.
  20. van Berkum, P. y Eardly, B. D. 1999. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* **68**:1132-1136.
  21. van Borm, S., Buschinger, A., Boomsma, J. J., y Billen, J. 2002. Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **269**:2023-2027.
  22. Velazquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernandez, M. P., Munoz, E., Mateos, P. F., Abril, A., Toro, N., Normand, P., Cervantes, E., Gillis, M. y Martinez-Molina, E. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1011-1021.
  23. Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B. y Martínez-Romero, E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a Leucaena leucocephala-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1687-1693.
  24. Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E y Chen, W. X. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:2231-2239.
  25. Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E, Wang, E. T., Han, S. Z., y Chen, W. X. 2002. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:2219-2230.
  26. Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. 2003. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* com. nov. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:1207-1217.
  27. Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E. T., Wei, G. H. y Chen, W. X. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:2219-2230.
  28. Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium*

undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:89-103.