

POBLACIONES DE RHIZOBIA NATIVAS DE MÉXICO

Esperanza MARTÍNEZ-ROMERO

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.
Ap Postal 565 – A. Cuernavaca, Morelos MÉXICO, D.F.

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno puede sustituir el uso de fertilizantes químicos en la agricultura y prevenir la pérdida de la fertilidad del suelo. Este proceso sólo lo realizan bacterias, algunas de éstas (del tipo *rhizobia*) se establecen en las raíces de plantas leguminosas proporcionándoles el nitrógeno que necesitan para su crecimiento. El interés de la investigación en estas bacterias es el poder utilizarlas eficientemente en la agricultura. En los países tropicales y subtropicales, como México, existen una gran riqueza de *rhizobia* cuya diversidad se presenta en este artículo.

Palabras Clave: bacterias nitrificantes, *Rhizobium*, diversidad, fijación de nitrógeno

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation may substitute for the use of chemical fertilizers in agriculture and prevent the loss of soil fertility. This process is only performed by bacteria, some of which (belonging to *rhizobia*) associate to the roots of plants providing part of the nitrogen plants need for growth. Research interest on these bacteria is driven by the interest in using them efficiently in agriculture. In tropical and subtropical countries, as Mexico, there is a large diversity of *rhizobia* reviewed here.

Key Words: nitrificant bacteria, *Rhizobium*, diversity, nitrogen fixation

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young 1992). Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas y, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Martínez & Hernández 1999). La asociación *Rhizobium*-leguminosa contribuye entre un 1/3 y un 1/2 del nitrógeno fijado de la atmósfera y se basa en el intercambio de carbono por nitrógeno entre ambos simbioses ya que para las plantas el nutriente más limitante es el nitrógeno.

Uno de los problemas fundamentales que enfrenta la humanidad es la producción de alimentos en cantidad suficiente. Para la solución de este problema se ha recurrido a la utilización de fertilizantes, los cuales se aplican cada vez en cantidades mayores. El uso masivo de los fertilizantes ha generado diversos problemas; por ejemplo, la contaminación de los suelos, de los mantos acuíferos y cuerpos de agua. Ante esta situación se realizan esfuerzos por conocer los sistemas biológicos y poder modificar las prácticas agrícolas lo suficiente para que sea la fijación biológica de nitrógeno la que reemplace al nitrógeno extraído del suelo por los cultivos, y no la aplicación de los fertilizantes. Además del nitrógeno, el desarrollo de las plantas está determinado en buena parte por los microorganismos con los que éstas se asocian. Algunos de ellos pueden suprimir diversos patógenos evitando enfermedades o, como *Azospirillum* y *Acetobacter*, que pueden estimular el crecimiento de la planta al producir hormonas vegetales, (Okon & Kapulnik 1986, Fuentes-Ramírez *et al.* 1993), otros proporcionan distintos promotores del crecimiento

vegetal como el lumichrome que produce *Rhizobium meliloti* y que estimula la respiración de la raíz y el desarrollo de plantas de alfalfa (Phillips *et al.* 1999).

Las leguminosas son ricas como fuente de proteína tanto para la alimentación humana como para el ganado. La producción de plantas leguminosas depende en gran medida de la fijación de nitrógeno que se realiza en simbiosis por el *Rhizobium* específico. Existen cerca de 19,000 especies de leguminosas (Allen & Allen 1980), la mayoría aún no aprovechadas por el hombre. Sólo se conocen los simbiosites para alrededor del 1% de las leguminosas que forman nódulos fijadores de nitrógeno (Martínez-Romero & Caballero-Mellado 1996).

Se ha generado un gran conocimiento sobre *rhizobia* que se ha centrado en unas tres o cuatro especies (Fisher & Long 1992, Kaneko *et al.* 2000, Galibert *et al.* 2001, Göttfert *et al.* 2001); en cambio, existe un gran desconocimiento sobre la biodiversidad global de estas bacterias. La riqueza de *rhizobia* es mayor en suelos tropicales y subtropicales que en suelos templados, concordante con la mayor riqueza de leguminosas en estas zonas (Yanagi & Yamasato 1993).

Diversidad funcional y taxonómica del grupo.

Todas las especies de *rhizobia* forman nódulos en las raíces o tallos de las leguminosas y se establecen dentro de estas estructuras en donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno. Existe especificidad en esta relación, lo que significa que una especie de leguminosa establece simbiosis con un limitado número de especies de *rhizobia* (Long 1989). Se han identificado diferentes sitios de diversificación de las leguminosas y éstos coinciden con los sitios de diversificación de los *rhizobia* que son capaces de establecer simbiosis con las leguminosas en cuestión (Martínez-Romero & Caballero-Mellado 1996).

En los últimos años se ha incrementado el número de especies y géneros de *rhizobia* porque se han analizado leguminosas que no se habían estudiado y porque la metodología para clasificar bacterias es más poderosa. Utilizando enfoques de biología molecular, se han establecido también las relaciones filogenéticas de estas bacterias (Van Berkum & Eardly 1998). En el cuadro 1 se listan las especies y géneros de *rhizobia*.

Cuadro 1
Taxonomía actual de *rhizobia*

Género	Especie	Huésped
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i> (soya)
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i> (garbanzo)
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarum</i>	Acacia, <i>Leucaena</i>
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> , <i>Sophora</i> , <i>Glycine</i> y otras
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol), <i>Mimosa affinis</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>

	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosanthes, Centrosema, Desmodium, Tephrosia</i>
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia (chícharo), Trifolium (trébol)</i>
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i>
	<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal, Prosopis chilensis</i>
	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal, Prosopis chilensis</i>
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp</i>
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa (alfalfa)</i>
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>S. terangae</i>	<i>Sesbania, Acacia</i>
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>

Patrones de diversidad taxonómica en México.

México es uno de los sitios de origen del frijol, *Phaseolus vulgaris*, y de diferentes especies de *Leucaena*, *Mimosa*, *Sesbania* y *Acacia* y de otras muchas leguminosas. El aislamiento de las bacterias de estas leguminosas ha revelado en algunos casos una diversidad genética enorme y nos ha llevado a proponer nuevas especies de *Rhizobium*, las cuales son nativas de México y no se encuentran en otros sitios salvo en las ocasiones en que, ya sea deliberadamente o no, han sido introducidas en estos lugares. Por ejemplo, encontramos que las semillas de frijol pueden diseminar a sitios geográficos distantes a la especie *Rhizobium etli*, que portan sobre su testa (Pérez-Ramírez *et al.* 1998).

Es precisamente *R. etli* el microsimbionte que seguramente co-evolucionó con el frijol (Segovia *et al.* 1993) y el más eficiente en fijación de nitrógeno con las líneas Mesoamericanas de *Phaseolus vulgaris* (Martínez-Romero *et al.* 1998a).

También se han descrito dos biovariedades de *R. etli*, una con especificidad preferente para frijol y otra con especificidad más amplia que incluye a *Leucaena* spp, *Mimosa affinis* y frijol. Esta última, la biovariedad mimosa, es más limitada en su diversidad genética (heterozigosis promedio, $H=0.2$, calculado de acuerdo con Selander *et al.* 1986) que la biovariedad phaseoli ($H=0.6$). La amplia diversidad del biovar phaseoli (Piñero *et al.* 1988, Segovia *et al.* 1991, Eardly *et al.* 1995) se correlaciona con la gran distribución geográfica del cultivo del frijol.

En las semillas de frijol la diversidad genética de *R. etli* es muy limitada indicando que sólo algunos clones sobreviven a la desecación (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998). También hemos encontrado *R. etli* dentro de tallos y raíces de maíces cultivados en asociación con frijol (Gutiérrez-Zamora y Martínez Romero 2001).

El patrimonio de *Rhizobium* de México también incluye a *R. huautlense* (Wang *et al.*, 1998) que sólo se ha aislado de la reserva ecológica Sierra de Huautla en Morelos y que es simbionte específico de *Sesbania herbacea*. *R. huautlense* tiene una diversidad genética muy limitada y está adaptado a la nodulación en condiciones de inundación (Wang & Martínez-Romero 2000). Hemos documentado nuevos grupos de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* aislados en *Leucaena* que no han sido reportados como simbioses de esta especie en otros lugares (Wang *et al.* 1999).

Dentro del género *Sinorhizobium* se sabe que *S. meliloti* y *S. medicae* nodulan a la alfalfa. Se ha analizado la diversidad y dominancia de aislados de alfalfa del Bajío mediante su sensibilidad a antibióticos, así como su competencia saprofítica y su efectividad en alfalfa (Olalde Portugal & Peña Cabriales 1989a y b). Algunos de estos aislados no se asemejan a *S. meliloti* o *S. medicae* (Peña Cabriales & J. Caballero, comunicación personal) pero no se ha formalizado su posición taxonómica. Esto es

también el caso para otros aislamientos descritos en México de nódulos de diversas leguminosas como *Leucaena* y *Gliricidia* (Valdes *et al.* 1993, Peñaloza & Márquez 1988).

Patrones de abundancia y diversidad por ambientes.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen ventaja sobre otras bacterias en condiciones donde el nitrógeno disponible es limitante o completamente deficiente. Se ha encontrado que los fertilizantes nitrogenados añadidos a los cultivos tienen efectos negativos sobre las poblaciones de fijadores de nitrógeno.

La diversidad genética de *Rhizobium* aislados de nódulos de fríjol disminuye considerablemente en algunas variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), si se siembran éstas en presencia de fertilizantes nitrogenados (Caballero-Mellado & Martínez-Romero 1999). El nitrógeno fijado añadido como fertilizante químico inhibe la formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno cuando se añade a plantas noduladas. El proceso de fijación de nitrógeno es muy costoso energéticamente y esto tal vez explique la fácil pérdida de los genes de fijación de nitrógeno (Martínez-Romero *et al.* 1999). El grupo de Souza *et al.* ha descrito la diversidad por niveles, por nódulo, por planta y por parcela, usando patrones de isoenzimas para describir los aislados y diferentes análisis estadísticos para cuantificar la diversidad. En general en cada nódulo hay un solo tipo de cepa, pero los nódulos de una sola raíz los forman una gran diversidad de *R. etli*. Esta diversidad designada "por planta" casi es tan grande como la que se obtiene de toda una parcela (Souza *et al.* 1994).

La estructura genética de la población en parcela se describe como reticulada, que significa que se intercambia información genética en poblaciones locales (Silva *et al.* 1999). En la semilla del fríjol hemos reportado la presencia de *rhizobia* viable. La diversidad "por semilla" es muy baja comparada con la población de nódulos (Pérez-Ramírez *et al.* 1998). En nuestro país se ha encontrado que las poblaciones de *Rhizobium* aisladas de nódulos de *Leucaena* son diferentes genéticamente si se cultiva a esta planta en suelos donde se había cultivado previamente al fríjol (Wang *et al.* 1999).

Estudios en campo.

Se han realizado diversos experimentos de inoculación de leguminosas en México. Cuando se introdujo el cultivo de la soya en el Noroeste, también se adoptó la práctica de inocular con cepas de *Rhizobium* (ahora reclasificados como *Bradyrhizobium*). La respuesta a la inoculación fue muy buena con incrementos en rendimiento pero sólo durante los primeros años debido a que al parecer *Bradyrhizobium* se estableció en suelo y ya no fue necesario añadir más bacterias como inoculantes.

En fríjol, la experiencia de inoculación ha tenido resultados muy variables. El problema principal que existe es la población de *R. etli* nativa, altamente adaptada y competitiva para nodular. En general, las bacterias introducidas como inoculante forman una proporción muy pequeña, menor al 5% de los nódulos. El resto lo forman las cepas nativas. Para resolver este problema, se ha propuesto que la selección de las mejores fijadoras se realice a partir de la población nativa del sitio donde se piensa trabajar y que se analicen los determinantes genéticos de la competencia (Martínez-Romero & Rosenblueth 1990).

Las cepas nativas altamente competitivas ocasionan que en muchos casos no se obtenga respuesta a la inoculación. Mediante la cuidadosa selección de cepas efectivas y utilizando cepas modificadas genéticamente, se ha logrado obtener en ensayos de campo (en colaboración con el INIFAP) incrementos en el contenido de nitrógeno de las semillas (Burgos *et al.* 1999 & J. Mora, comunicación personal).

Ciertamente se requiere inocular en los casos en los que no se encuentra la especie de *Rhizobium* en el suelo o sólo se encuentra en muy bajos números para nodular a la leguminosa de interés. En estos casos, la respuesta a la inoculación es clara salvo que existieran antagonistas de la nodulación como se ha reportado cuando se desmontan las selvas, cuando existen contenidos de nitrógeno y materia orgánica muy altos que inhiben la nodulación y fijación de nitrógeno o bien que sean muy escasos el fósforo o el molibdeno.

PERSPECTIVAS

Uno de los objetivos de la investigación en fijación de nitrógeno es sustituir fertilizantes químicos por inoculantes biológicos. Para esto es necesario obtener cepas bacterianas con esta capacidad, aisladas de las plantas de interés, de su rizósfera o de nódulos.

La búsqueda y el aislamiento de fijadores de nitrógeno se requiere como la base para la producción de inoculantes bacterianos que estimulen la producción vegetal. Actualmente hemos empezado un estudio para aislar y caracterizar fijadores de nitrógeno obtenidas de leguminosas de la selva. El determinar por qué las inoculaciones funcionan en ciertas ocasiones y en otras fallan requiere más investigación; además, las bacterias rizosféricas se pueden manipular genéticamente para degradar compuestos contaminantes como una estrategia de bioremediación o para suprimir patógenos.

CONCLUSIONES

Sólo se ha explorado una pequeña proporción de la riqueza de rhizobia existente en México. En la medida en que se conserven las especies nativas de leguminosas, se preservará también sus microsimbiontes siempre y cuando estas plantas no se siembren en presencia de fertilizantes químicos que inhiben el proceso simbiótico.

Las leguminosas son cultivos clave en la agricultura sustentable ya que enriquecen al suelo de nitrógeno cuando tienen nódulos fijadores de nitrógeno. Para promover la nodulación se recomienda la práctica de inocular con cepas seleccionadas (adaptadas al lugar de interés) o mejoradas genéticamente. El conocimiento básico de *Rhizobium* provee de herramientas para mejorar estas cepas y aumentar su capacidad de fijar nitrógeno (Martínez-Romero *et al.* 1998b).

Al igual que en el caso de *Rhizobium*, sólo se conocen una minoría de los microorganismos existentes en la naturaleza, los cuales son necesarios en los ciclos biogeoquímicos. Tal vez estamos extinguiendo muchos microorganismos sin darnos cuenta, tal y como ha ocurrido con la diversidad genética de sitios del Amazonas afectados por la deforestación (Borneman & Triplett 1997). Es necesario preservar las selvas y bosques tropicales para también preservar microorganismos del suelo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Julio Martínez Romero por el apoyo técnico y a DGAPA IN202097.

LITERATURA CITADA

Allen, O. N. y Allen, E. K. 1980. The *Leguminosae*; a source book of characteristics, uses, and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, WI.

- Borneman J., & E. W. Triplett.** 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2647-2653
- Burgos, P. A., Castellanos, J., Mora, Y., & J. Mora.** 1999. Field inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with high efficiency *Rhizobium* strains. pp. 255-257. In: E. Martínez & G. Hernández. (Eds). Highlights of Nitrogen Fixation Research. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E.U.A.
- Caballero-Mellado, J. & E. Martínez-Romero.** 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, 26:111-121.
- Eardly, B. D., Wang, F. -S., Whittam, T. S. & R. K. Selander.** 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:507-512.
- Fisher, R. F. & S. R. Long.** 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*, 357:655-660.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Jiménez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R. & J. Caballero-Mellado.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*, 154:145-150.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., et al.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kündig, C., Beck, C., Marty, R. & H. Hennecke.** 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* 183: 1405-1412.
- Gutiérrez-Zamora, M. L. & E. Martínez-Romero.** 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* (en prensa).
- 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. & S. Tabata.** 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- Long, S. R.** 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*, 56:203-214.
- Martínez, E. & G. Hernández.** (Eds.) 1999. Highlights of Nitrogen Fixation Research. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E.U.A.
- Martínez-Romero, E. & M. Rosenblueth.** 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2384-2388.
- Martínez-Romero, E. & J. Caballero-Mellado.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 15:113-140.
- Martínez-Romero E., Hernández-Lucas, I., Peña-Cabriales, J. J. & J. Z. Castellanos.** 1998a. Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strains in assays with *Phaseolus vulgaris* beans that have a high capacity to fix N₂. *Plant Soil*, 204:89-94.
- Martínez-Romero, E., Palacios, R. & J. Mora.** 1998b. Cepas mejoradas de *Rhizobium*. *Investigación y Ciencia, Edición en español de Scientific American*, 265:14-19.
- Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J., Gándara, B., Rogel, M. A., López-Merino, A., Wang, E. T., Fuentes-Ramírez, L. E., Toledo, I., Martínez, L., Hernández-Lucas, I. & J. Martínez-Romero.** 1999. Ecological, phylogenetic and taxonomic remarks on diazotrophs and related genera. In: F. O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yales & W. E. Newton (Editores). *Nitrogen Fixation: from*

molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.

- Melchor-Marroquín, J. I., Vargas-Hernández, J. J., Ferrera-Cerrato, R., & Krishnamurthy, L.** 1999. Screening *Rhizobium* spp. strains associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, Mexico. *Agroforestry Systems*, 46:25-38.
- Okon, Y. & Y. Kapulnik.** 1986. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. *Plant Soil*, 90:3-16.
- Olalde-Portugal, V. & J. J. Peña-Cabriales.** 1989a. Poblaciones nativas de *Rhizobium meliloti* en el Bajío, México, I: Diversidad, dominancia y efectividad. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 31:279-283.
- _____. 1989b. Poblaciones nativas de *Rhizobium meliloti* en el Bajío, México, II: Competencia saprofítica. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 31:285-291.
- Peñaloza, V. A. & R. C. Márquez.** 1988. Estudios bioquímicos y fisiológicos de cepas de *Rhizobium loti* aislados de *Leucaena leucocephala*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 30:341-350.
- Pérez-Ramírez, N. O., Rogel, M. A., Wang, E. Castellanos, J. Z. & E. Martínez-Romero.** 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26:289-296.
- Phillips, D. A., Joseph, C. M., Yang, G.-P., Martínez-Romero, E., Sanborn, J. R. & H. Volpin.** 1999. Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium enhancer* of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:12275-12280.
- Piñero D., Martínez, E. & R. K. Selander.** 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2825-2832.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R. & E. Martínez-Romero.** 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:426-433.
- Segovia, L., Young, J. P. W. & E. Martínez-Romero.** 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:374-377.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. & S. M. Whittam.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:873-884.
- Silva, C., Eguarte, L. E., & V. Souza.** 1999. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.*, 8:277-287.
- Souza, V., Eguarte, L., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J., & D. Piñero.** 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1260-1268.
- Valdés, M., Reza-Alemán, F. & V. Furlan.** 1993. Response of *Leucaena esculenta* to endomycorrhizae and *Rhizobium* inoculation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9:97-99.
- Van Berkum, P. & B. D. Eardly.** 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. pp. 2-21. In: H. P. Spaink, A. Kondorosi & P. J. J. Hooykaas (Eds.). *The Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Wang, E. T., Van Berkum, P., Beyene, D., Siu, X. H., Dorado, O., Chen., W. X. & E. Martínez-Romero.** 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48:687-699.

- Wang, E. T., Martínez-Romero, J. & E. Martínez-Romero.** 1999. Genetic diversity of *Rhizobium* from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Mol. Ecol.*, 8:711-724.
- Wang, E. T., & E. Martínez-Romero.** 2000. Sesbania herbacea-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of S. herbacea-nodulating *rhizobia* in different environments. *Microbial Ecol.*, 40:25-32.
- Yanagi, M. & K. Yamasato.** 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107:115.
- Young, J. P. W.** 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. pp. 43-86. In: Stacey, Burns, y Evans (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York, U.S.A.