

03081

2

2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE
ACETOBACTER DIAZOTROPHICUS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA

JOSÉ DE JESÚS CABALLERO-MELLADO

AGOSTO, 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

El azúcar es producido en México y en más de 70 países del mundo. Además de ser un importante producto agrícola, más de 150 subproductos pueden ser obtenidos de la caña.

Muy altos niveles de fertilizantes nitrogenados (hasta 300-400 kg de N por ha.) son aplicados al cultivo de la caña de azúcar en la mayoría de los países, incluido México. En contraste, en Brasil se aplican no más de 50 kg de N por ha., no existiendo disminución en los rendimientos de caña ni en la reserva de nitrógeno del suelo aun después de décadas de cultivo. En experimentos recientes con diferentes variedades de caña se estimó que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) puede contribuir con 50 a 80% del nitrógeno total de la planta. Entre los diferentes fijadores de nitrógeno asociados a la caña se sugiere que la bacteria endófito *Acetobacter diazotrophicus* pudiera ser una de las que contribuyan importantemente en la FBN observada, debido a sus características poco comunes entre los diazotófos.

Tomando en cuenta el uso potencial de *A. diazotrophicus* en biotecnología agrícola, se consideró importante el conocer la diversidad genética y la estructura de la población de esta bacteria.

Un total de 79 cepas de *A. diazotrophicus* aisladas principalmente de diferentes variedades de caña cultivada en México y Brasil, así como de otras plantas ricas en sacarosa y de la "chinche harinosa" *Saccharicoccus sacchari* asociada a la caña fueron caracterizadas mediante electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE). También se analizaron los perfiles de plásmidos, así como los patrones de los genes *nifHDK* y de los genes ribosomales.

Los resultados de MLEE revelaron que la diversidad genética de *A. diazotrophicus* es mucho más baja que la observada en la mayoría de otras especies bacterianas conocidas. Se identificaron siete diferentes tipos electroforéticos (ETs) entre las cepas de *A. diazotrophicus* analizadas. Seis ETs presentan alta homología DNA-DNA, hallándose una media de 86% y relacionados entre sí a una distancia genética de 0.195. El séptimo ET fué muy divergente, encontrándose a una distancia genética de 0.53 y niveles de homología DNA-DNA de 54% con respecto a la cepa de referencia. Las cepas agrupadas en este ET pudieran representar una especie fijadora de N₂ diferente dentro del género *Acetobacter*. Una mayor diversidad genética se observó entre las cepas aisladas de Brasil en comparación a las aisladas de México. Este hecho probablemente esté relacionado con las muy diferentes dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas entre ambos países. El análisis genético indicó que la estructura de población de *A. diazotrophicus* es clonal, encontrándose una clona predominante (ET 1).

La mayoría de las cepas de *A. diazotrophicus* albergan plásmidos con un tamaño que varía entre 2.0 y 170 kb. Dos plásmidos (uno de 20-24 kb y otro de 170 kb) fueron muy conservados entre las cepas analizadas. La cepa tipo PA1 5^T y otras pocas no albergan ningún plásmido. La existencia de estas cepas puede indicar que las características fenotípicas fundamentales de *A. diazotrophicus* no son codificadas por plásmidos. De hecho, independiente de la presencia de plásmidos, todas las cepas comparten un patron común de organización de los genes *nifHDK* en el cromosoma.

Desde un punto de vista de aplicación biotecnológica, será importante determinar si las cepas agrupadas en el ET predominante pueden ser más eficientes en comparación a otros linajes clonales para promover el crecimiento de las plantas hospedadas, ya sea mediante la síntesis de ácido indol acético o mediante el suministro de nitrógeno.

VoBo.

Esperanza Martínez R
DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO
Asesora de Tesis

FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Cane sugar is produced commercially in Mexico and in over 70 countries around the world. Sugar is an important agricultural product, and more than 150 by-products may be obtained from sugarcane.

Commonly, very high levels of nitrogen fertilizers (up to 300-400 kg of N per ha) are applied in sugarcane crops in most countries, included Mexico. In contrast, sugarcane crops in Brazil do not receive more than 50 kg of nitrogen fertilizer, and neither cane yields nor soil N reserves appear to diminish after decades of culture. Recent experiments estimated that the contribution of biological nitrogen fixation (BNF) to the sugarcane cultivars ranged from 50 to 80% of total plant nitrogen. Among the different nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane plants, it is suggested that the endophytic bacterium *Acetobacter diazotrophicus* could be responsible of contributing importantly to the observed BNF, due to their little common physiological features among the diazotrophs.

Taking into account the potential use of *A. diazotrophicus* in agricultural biotechnology, we considered important to know the genetic diversity and genetic structure of this bacteria.

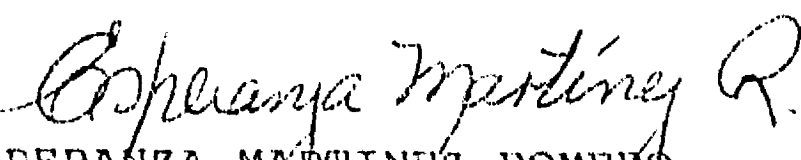
A total of 79 isolates of *A. diazotrophicus* recovered mainly from different sugarcane varieties cultivated in Mexico and Brazil, as well as from another sucrose-rich host plants, and from mealybugs *Saccharicoccus sacchari* associated with sugarcane plants were characterized by the electrophoresis mobilities of metabolic enzymes (MLEE). Plasmid profiles, *nifHDK* and ribosomal genes patterns were also analyzed.

The results of MLEE analyses revealed that there is a lower genetic diversity in these bacteria in comparison to the majority of other well-known bacterial species. Seven different electrophoretic types (ETs) were identified among isolates of *A. diazotrophicus* recovered from different hosts. Six ETs are highly homogeneous, exhibiting a mean DNA homology of 86% and related within 0.195 genetic distance. The seventh ET was largely divergent, separated at genetic distance of 0.53, and had only 54% DNA homology to the reference strain. Strains corresponding to this cluster could represent a distinct nitrogen-fixing species of the genus *Acetobacter*. More genetic diversity was encountered in isolates from Brazil than in those from Mexico, probably due to the very different nitrogen fertilization levels used in the crops. The genetic analysis indicates that the genetic structure of *A. diazotrophicus* is clonal, with a largely predominant clone (ET 1).

Plasmids were present in most *A. diazotrophicus* strains, and the molecular sizes of the plasmids ranged from 2.0 to 170 kb. Two plasmids (a 20-to 24-kb plasmid and another 170-kb) were highly conserved among the isolates examined. Type strain PAI 5^T and other few strains did not harbor any plasmid. The existence of plasmidless strains may indicate that fundamental phenotypic characteristics of this species are not plasmid encoded. In fact, regardless of presence of plasmids, all isolates shared a highly conserved *nifHDK* gene organization pattern on the chromosome.

From the viewpoint of biotechnological application, it will be important to determine if strains represented by the highly predominant ET 1 could be more efficient in promoting growth of the host plants by either involving indoleacetic acid or supplying nitrogen, or both, in comparison to other clonal lineages.

Vo.Bo.


DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO
Asesora de Tesis

FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, U.N.A.M., bajo la Asesoría de la Dra. Esperanza Martínez Romero.

Comité Tutorial durante el posgrado:

Dra. Esperanza Martínez Romero

Dr. Jaime Mora Celis

Dr. Daniel Piñero D.

Dr. David Romero Camarena

Dr. Luis Servín

**A Uds. les expreso mi sincero agradecimiento por sus valiosas opiniones,
que con mucho contribuyeron al desarrollo del presente estudio.**

Jurado de Examen:

Dr. Jaime Mora Celis

Dr. Daniel Piñero D.

Dra. Esperanza Martínez Romero

Dra. Alejandra A. Covarrubias R.

Dr. David Romero Camarena

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dr. Lorenzo Segovia F.

**Sirva este medio para expresar a Uds. mi agradecimiento por su valiosa
contribución.**

Agradezco al personal directivo del CIFN-UNAM, particularmente al Dr. Rafael Palacios De la Lama, por el apoyo y seguridades brindadas.

Espe:

A tí que te gustan las frases breves simplemente te digo GRACIAS. Gracias por la ayuda brindada a lo largo de estos años, sobretodo en los momentos difíciles cuando llegué a tú laboratorio.

Jaime Mora:

Por su ayuda y confianza, mi sincero agradecimiento.

David Romero:

También a tí, en forma breve pero sincera te digo muchas gracias.

A mis amigos y a quienes así me consideran, gracias por su apoyo.

Agradezco al personal administrativo y de servicios del CIFN-UNAM la ayuda prestada en diferentes momentos.

Dedico este esfuerzo llamado Tesis:

A mis hijos Erivan y Vanadis, a quienes les he robado mucho de su tiempo y parte de su infancia por la consecución de esta meta.

A mi esposa Irma, por la virtud de conocer el tiempo y la paciencia, y ni que decir por el estímulo siempre recibido.

A mi madre María Mellado, por muchas razones.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	24
Justificación	26
Trabajo experimental	27
Discusión	31
Perspectivas de investigación	36
Conclusiones	38
Bibliografía	39
Anexos	61

RESUMEN

El azúcar es producido en México y en más de 70 países del mundo. Además de ser un importante producto agrícola, más de 150 subproductos pueden ser obtenidos de la caña.

Muy altos niveles de fertilizantes nitrogenados (hasta 300-400 kg de N por ha.) son aplicados al cultivo de la caña de azúcar en la mayoría de los países, incluido México. En contraste, en Brasil se aplican no más de 50 kg de N por ha., no existiendo disminución en los rendimientos de caña ni en la reserva de nitrógeno del suelo aun después de décadas de cultivo. En experimentos recientes con diferentes variedades de caña se estimó que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) puede contribuir con 50 a 80% del nitrógeno total de la planta. Entre los diferentes fijadores de nitrógeno asociados a la caña se sugiere que la bacteria endófito *Acetobacter diazotrophicus* pudiera ser una de las que contribuyan importantemente en la FBN observada, debido a sus características poco comunes entre los diazotófos.

Tomando en cuenta el uso potencial de *A. diazotrophicus* en biotecnología agrícola, se consideró importante el conocer la diversidad genética y la estructura de la población de esta bacteria.

Un total de 79 cepas de *A. diazotrophicus* aisladas principalmente de diferentes variedades de caña cultivada en México y Brasil, así como de otras plantas ricas en sacarosa y de la "chinche harinosa" *Saccharicoccus sacchari* asociada a la caña fueron caracterizadas mediante electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE). También se analizaron los perfiles de plásmidos, así como los patrones de los genes *nifHDK* y de los genes ribosomales.

Los resultados de MLEE revelaron que la diversidad genética de *A. diazotrophicus* es mucho más baja que la observada en la mayoría de otras especies bacterianas conocidas. Se identificaron siete diferentes tipos electroforéticos (ETs) entre las cepas de *A. diazotrophicus* analizadas. Seis ETs presentan alta homología DNA-DNA, hallándose una media de 86% y relacionados entre sí a una distancia genética de 0.195. El séptimo ET fué muy divergente, encontrándose a una distancia genética de 0.53 y niveles de homología DNA-DNA de 54% con respecto a la cepa de referencia. Las cepas agrupadas en este ET pudieran representar una especie fijadora de N₂ diferente dentro del género *Acetobacter*. Una mayor diversidad genética se observó entre las cepas aisladas de Brasil en comparación a las aisladas de México. Este hecho probablemente esté relacionado con las muy diferentes dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas entre ambos países. El análisis genético indicó que la estructura de población de *A. diazotrophicus* es clonal, encontrándose una clona predominante (ET 1).

La mayoría de las cepas de *A. diazotrophicus* albergan plásmidos con un tamaño que varía entre 2.0 y 170 kb. Dos plásmidos (uno de 20-24 kb y otro de 170 kb) fueron muy conservados entre las cepas analizadas. La cepa tipo PA1 5^T y otras pocas no albergan ningún plásmido. La existencia de estas cepas puede indicar que las características fenotípicas fundamentales de *A. diazotrophicus* no son codificadas por plásmidos. De hecho, independiente de la presencia de plásmidos, todas las cepas comparten un patron común de organización de los genes *nifHDK* en el cromosoma.

Desde un punto de vista de aplicación biotecnológica, será importante determinar si las cepas agrupadas en el ET predominante pueden ser más eficientes en comparación a otros linajes clonales para promover el crecimiento de las plantas hospederas, ya sea mediante la síntesis de ácido indol acético o mediante el suministro de nitrógeno.

INTRODUCCION

La fijación biológica del nitrógeno (FBN), es decir, la reducción del nitrógeno de la atmósfera a amonio, representa junto con la fotosíntesis uno de los procesos clave responsables de mantener la vida en la tierra. Ambas actividades constituyen las principales vías de entrada de carbono y nitrógeno en el componente vivo de los ecosistemas naturales. En tanto la fotosíntesis es llevada a cabo por organismos procariotes y eucariotes, la FBN se restringe solamente a algunos procariotes, los cuales pueden vivir libremente o en asociación, principalmente con plantas.

Aún cuando las leguminosas pueden cubrir sus necesidades de nitrógeno naturalmente a través de bacterias asociadas, la agricultura intensiva ha demandado en los últimos 50 años el suministro de fertilizantes minerales, particularmente de los nitrogenados. Estos se proporcionan en forma de sales de amonio, nitratos o urea. En los suelos agrícolas, los iones NH_4^+ son convertidos por las bacterias nitrificantes en el ion nitrato, por lo que ésta forma es la dominante (Oaks, 1992). El NO_3^- que no es asimilado por las raíces o inmovilizado por las poblaciones microbianas del suelo, se pierde rápidamente de la zona de exploración radical, ya sea por lixiviación o bien por desnitrificación. Se ha reportado (Mulder y col. 1977) que solamente del 50-60% del nitrógeno aplicado como fertilizante mineral es aprovechado por las plantas y el 20% se pierde debido a la alta solubilidad de los NO_3^- , es decir, son lixiviados hacia los mantos freáticos que a su vez los transportan hasta los cuerpos de agua superficiales. Del 10 al 15% se pierde por la actividad desnitrificante, liberando a la atmósfera NO y N_2O y el resto es inmovilizado por las poblaciones microbianas del suelo.

El fertilizante no asimilado por los cultivos se traduce en pérdidas económicas para el agricultor, pero el problema rebasa el aspecto financiero. Así, el nitrógeno aplicado como NH_4^+ o NO_3^- inhiben en mayor o menor grado la fijación de N_2 en

la rizosfera, y también el establecimiento de las importantes asociaciones formadas por diferentes especies de *Rhizobium* con leguminosas (Curl y Truelove, 1986). El resultado final para el ambiente es su contaminación, tanto de la atmósfera (Bohlool y col. 1992), como de los cuerpos de agua (Mulder y col. 1977).

Lo anterior es un ejemplo de como la agricultura intensiva altera drásticamente el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, por lo cual sería conveniente que las prácticas agrícolas fueran modificadas lo suficiente como para permitir que los sistemas biológicos, más que los fertilizantes minerales, pudieran reemplazar el N del suelo extraído por los cultivos.

Es conocido que las plantas al crecer bajo condiciones naturales interaccionan continuamente con una amplia variedad de microorganismos, muchos de los cuales contribuyen al crecimiento de las plantas y pueden favorecer el rendimiento de los cultivos a través de diferentes mecanismos. Las principales actividades de las rizobacterias que benefician el desarrollo de las plantas, incluyen la supresión competitiva de patógenos (Kerr, 1980; Schroth y Hancock, 1981), la solubilización de minerales (Barea y col. 1976), la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Libbert y col. 1966; Mascarúa-Esparza y col. 1988; Strzelezyk y Burdziej, 1984), y la fijación de nitrógeno (Diem y col. 1983; Yoo y col. 1986). Diversas revisiones han sido publicadas al respecto (Gaskins y col. 1985; Henzell, 1988; Lynch, 1990; Schanck y col. 1983). La investigación para mejorar la respuesta de los cultivos se ha concentrado en el estudio de las bacterias fijadoras de nitrógeno autóctonas de la rizosfera, destacándose los extensos estudios realizados sobre la asociación *Rhizobium*-leguminosas (Bauer, 1981; Bottomley, 1992; Fisher y Long, 1992; Graham, 1981; Martínez y col. 1990; Martínez- Romero, 1994; Schlaman y col. 1992; Vincent, 1974 y 1977). Exceptuando los amplios estudios realizados sobre la rizocenosis *Azospirillum*-gramíneas (Caballero-Mellado y col. 1992; Döbereiner y col. 1976; Tien y col. 1979; y los citados en Döbereiner y Pedrosa, 1987; Hubbell

y Gaskins, 1984; Michiels y col. 1989; Okon y Kapulnik, 1986; Okon y Labandera, 1994), muy poco se conoce sobre otras poblaciones bacterianas rizosféricas asociadas a no leguminosas, y menos aún sobre las poblaciones diazotróficas endófitas de otras plantas de cultivo. Esto es particularmente cierto para plantas como la caña de azúcar, de las cuales se han aislado en años recientes algunas especies diazotróficas, predominante y/o estrictamente endófitas.

A pesar de que el origen de la caña de azúcar es controvertido, parece ser que el centro primario de diversidad de *Saccharum officinarum* corresponde al área de Nueva Guinea (Liu, 1984), cultivándose actualmente en más de 70 países de regiones tropicales, generalmente entre los 35° N y 35° S de latitud (Nickell, 1983). La mayoría de las centenas de variedades comerciales de caña que se cultivan en la actualidad, derivan principalmente del germoplasma de 20 variedades de *S. officinarum* y de menos de 10 variedades de *S. spontaneum*, lo cual explica su limitada variabilidad genética (Liu, 1984).

La importancia agrícola del cultivo de la caña radica fundamentalmente en la obtención de azúcar, el cual es usado tanto para consumo interno de la población como para exportación, significando para algunos países en desarrollo una de las más importantes fuentes de ingresos. Además de este uso directo, más de 150 subproductos pueden ser obtenidos de la industria azucarera, entre ellos, electricidad, papel y alimento animal, así como ácidos orgánicos y etanol (Paturau, 1988). Entre éstos ejemplos puede destacarse la producción brasileña de alcohol en volúmenes de 12×10^9 litros anuales, obtenidos mediante la fermentación y posterior destilación del jugo de caña, el cual es usado en su forma pura (93-95%) como combustible para 4 millones de vehículos y otros 7 millones usan "gashol" que contiene 10 a 22% de etanol (Boddey, 1991).

Entre las muchas variables involucradas en el costo de producción del cultivo de la caña, pueden mencionarse los gastos en fitohormonas (Nickel, 1983), control de

insectos plaga (particularmente del grupo de los gusanos "barrenadores") (Flores Cáceres, comunic. personal), así como en la adquisición de los fertilizantes nitrogenados, debido a que éste macronutriente es el principal factor limitante en los suelos de las regiones tropicales (Graham et al. 1988).

El cultivo de la caña de azúcar es considerado como altamente extractivo de nutrientes del suelo. En el primer ciclo, el cultivo de la caña extrae de 120 a 270 Kg de nitrógeno por hectárea, en tanto que la extracción de nitrógeno en el segundo corte varía de 100 a 170 Kg/ha (Sampaio y col. 1984; Urquiaga y Bodey, 1987). Estos datos implican, que sin el uso de los fertilizantes nitrogenados, el cultivo continuo de la caña de azúcar puede agotar rápidamente la reserva de nitrógeno del suelo, aún aquellos de alta fertilidad, por lo que este cultivo se ha fertilizado tradicionalmente con muy altas cantidades de fertilizantes minerales. La aplicación de éstos varía de 200 a 400 Kg N/ha (aproximadamente de 1 a 2 toneladas de sulfato de amonio) en países como Estados Unidos, Cuba ó Venezuela. En México este cultivo ocupa uno de los primeros lugares por superficie sembrada, cultivándose en el ciclo 1990 alrededor de 678,000 hectáreas (INEGI, 1992) con aplicaciones que varían entre 120 y 320 Kg N/ha (Minjárez Castro; Martínez Arroyo, comunic. personal), dependiendo de la región cañera. En contraste, Brasil fertiliza el cultivo con dosis no mayores a 50 Kg N/ha (Ruschel y Vose, 1984), equivalente a 235 Kg de sulfato de amonio, obteniendo rendimientos medios de 65 toneladas de caña por hectárea. Estos rendimientos son comparables a los obtenidos en los países que aplican hasta 6 veces más fertilizante nitrogenado, e incluso, han logrado obtener con algunas variedades rendimientos equivalentes a 200 toneladas de caña que acumulan 200 Kg N/ha/año. Los altos rendimientos de caña obtenidos aún con bajos niveles de fertilización nitrogenada sugieren que una parte importante de este nutriente proviene de la FBN (Urquiaga y col. 1989 y 1992). Estudios realizados mediante el balance $^{15}\text{N}/\text{N}$ mostraron que algunas variedades de caña obtienen hasta el 80% del

nitrógeno necesario para su crecimiento a través de la FBN (Boddey y col. 1991).

La caña de azúcar se propagada generalmente de forma vegetativa a partir de trozos de tallo (esquejes) que presentan entrenudos. Debido al intenso intercambio internacional de germoplasma de variedades de caña de azúcar, esta forma de propagación ha contribuido a la dispersión mundial de enfermedades "encubiertas", como ocurrió con la enfermedad denominada "escaldadura" de la hoja de la caña de azúcar, causada por *Xanthomonas albilineans*, la cual se dispersó tanto en los países del área del Caribe como en Estados Unidos y África (Koike, 1968). La misma situación de dispersión se presenta probablemente con las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno de la caña de azúcar, las cuales permanecen en un estado latente en el interior de los esquejes hasta el momento en que se inicia la emergencia del nuevo tallo y la formación de nuevas raíces (Patriquin y col. 1980).

Se conoce que existe una alta incidencia de bacterias aeróbicas y anaeróbicas fijadoras de nitrógeno en todo el sistema radicular (Ruschel, 1981), realizándose la FBN tanto en la raíz como también en las "semillas" (esquejes) de siembra de la caña, una vez que ha iniciado la germinación (Ruschel y col. 1975). Se ha reportado (Patriquin y col. 1980) que las poblaciones de diazótrofos conforman entre el 1 y 10% de la población bacteriana que vive en el interior del tallo de la caña. Entre las especies bacterianas aisladas del interior de raíces y/o tallos de la caña se encuentran *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa*, *Azotobacter vinelandii*, (Rennie y col. 1982), *Azospirillum* spp. (Döbereiner y col. 1988), *Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Baldani y col. 1992) y la más recientemente aislada *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante y Döbereiner, 1988), actualmente reclasificada como *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis y col. 1989). Algunas bacterias como *Beijerinckia* (Döbereiner, 1961), *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter cloacae* y *Derxia gummosa* son frecuentemente aislados de la rizosfera de la caña (Hegazi y col. 1979, McCarley y Rennie, 1980).

A pesar de haberse logrado observar (Arias y col. 1978) y aislar un elevado número de bacterias fijadoras de nitrógeno, tanto de la rizosfera como del interior de las raíces y del tallo de la caña de azúcar, aún no se conoce cuál o cuáles de estas bacterias diazotróficas, rizosféricas y/o endófitas, pudiera(n) ejercer un mayor impacto en la economía del nitrógeno de la planta. Posiblemente las bacterias endófitas sean responsables de mayores tasas de fijación de N_2 que las rizosféricas, dada la mayor disponibilidad de nutrientes y menor competencia por éstos en el interior de la planta que en la rizosfera. Se ha sugerido que *A. diazotrophicus* pudiera ser una de las más importantes, debido a su naturaleza endófitas y a sus características fisiológicas poco comunes entre los diazótrofos (Boddey y col. 1991), las cuales favorecerían la FBN *in planta*.

A. diazotrophicus pertenece al grupo de las llamadas bacterias del ácido acético de la familia *Acetobacteraceae* formada por los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De Ley y col. 1984), correspondiendo a la subclase alfa de las Proteobacterias (Gillis y col. 1989). El nivel de homología DNA-DNA de 84% entre cepas representativas de esta bacteria, indican la existencia de un sólo grupo (Gillis y col. 1989). *A. diazotrophicus* es la única especie de la familia *Acetobacteraceae* con la capacidad de fijar N_2 . Comparte con otros miembros de esta familia la capacidad de formar ácido acético de etanol y puede oxidarlo, al igual que el lactato, a CO_2 (De Ley y col. 1984; Swings, 1992). Crece a elevadas concentraciones de sacarosa y glucosa (incluso 30%), y el crecimiento óptimo se presenta a alrededor de 30°C y pH de 5.5, pudiendo crecer y fijar N_2 aún a pH 3.0 (Cavalcante y Döbereiner, 1988). La fijación de nitrógeno atmosférico se lleva a cabo en condiciones microaerofílicas aún en presencia de altas concentraciones de NO_3^- (10 mM) y es sólo inhibida parcialmente por 20 mM de $(NH_4)_2SO_4$ o por aminoácidos (Stephan y col. 1991).

A. diazotrophicus ha sido aislado del interior de raíces y tallos de diferentes

variedades de caña cultivada en Brasil (Cavalcante y Döbereiner, 1988), Australia (Li y Macrae, 1991) y México (Fuentes y col. 1993; ver antecedentes), lográndose la mayor frecuencia de aislamientos de la región apical de los tallos (Fuentes y col. 1993). También ha sido aislada del interior de las raíces y tallos de *Pennisetum purpureum* var. Cameroon, así como del camote (*Ipomoea batatas*), pero en ninguna ocasión se ha logrado recobrar de suelo o de otras familias de plantas (Döbereiner y col. 1993). El aislamiento de *A. diazotrophicus* también se ha logrado del interior de esporas del hongo micorrízico *Glomus clarum* (Paula y col. 1991), así como del homóptero *Saccharicoccus sacchari* (íntimamente asociado a la caña de azúcar), pero no de otros insectos estudiados (Ashbolt e Inkerman, 1990). Estos autores han sugerido que *A. diazotrophicus* puede ser microbiota autóctona de *S. sacchari*, el cual es común hallarlo en todos los países donde la caña es cultivada (Flores y Abarca, 1961; Flores Cáceres, comunic. personal, 1994). El conjunto de los datos anteriores permitieron demostrar que *A. diazotrophicus* es una bacteria predominantemente endófito, adaptada a microambientes donde existe abundante sacarosa y ligera acidez.

El interés por los microorganismos y en particular por las bacterias, ha sido generado en gran medida por el daño que causan o por los beneficios que se pueden obtener de ellos. Diferentes enfoques experimentales se han utilizado para su estudio. Así, el estudio sistemático de un taxon bacteriano particular se inicia con su aislamiento en cultivo puro. Sin embargo, algunas especies no han sido aisladas aún en la actualidad en medios de laboratorio, siendo conocidas sólo por observaciones microscópicas (Schlegel y Jannasch, 1992). Al respecto, Torsvik y col. (1990), señalan que entre el 99.5 y 99.9% de las bacterias del suelo, observadas al microscopio de fluorescencia, no se pueden cultivar en el laboratorio. Estos autores demuestran mediante desnaturalización térmica y reasociación del DNA (extraído de la fracción bacteriana del suelo), la existencia de cerca de 4,000 genomas bacterianos

diferentes, correspondiendo la mayor diversidad a la parte de la comunidad la cual no puede ser cultivada.

Especies y géneros bacterianos han sido y aún son descritos, en muchos de los casos, sobre la base de unas cuantas cepas, e incluso sobre la base de una sola (Trüper y Schleifer, 1992), utilizando principalmente como criterios de identificación y clasificación un conjunto variable de características fenotípicas. En el manual Bergey's (Williams y col. 1984) puede apreciarse que la mayoría de los métodos de identificación bacteriana se basan en el análisis de características que evalúan caracteres morfológicos (macro y microscópicos) y estructurales, así como caracteres nutricionales, metabólicos y también parámetros ecológicos. En estos últimos se incluyen la asociación simbiótica con plantas y patogenicidad sobre plantas hospederas o animales. Nuevos y mejores métodos taxonómicos incluyen la determinación de la composición química de diversos constituyentes celulares, métodos inmunológicos y genéticos. Entre los métodos genéticos destacan la hibridación de ácidos nucleicos (DNA/DNA, DNA/RNA), la relación de bases del DNA y la secuencia comparativa de oligonucleótidos del 16S rRNA, los cuales han permitido en diferentes casos, además de la identificación y clasificación de las bacterias, la elucidación de sus relaciones filogenéticas como reflejo de sus características evolutivas (ver Schleifer y Stackebrandt, 1983; Stackebrandt, 1992).

En múltiples estudios, empleando muy diversos métodos (Baldani y col. 1992; Bloom y col. 1989; Brockman y Bezdicek, 1989; Denny, 1988; Gillis y col. 1989; Glynn y col. 1985; Magariños y col. 1992; Sadowsky y col. 1987) y particularmente con el análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) (Clark-Curtiss y Walsh, 1989; Fani y col. 1991; Gabriel y col. 1988; Laguerre y col. 1994; Lazo y col. 1987; Mavingui y col. 1992; Römling y col. 1994; Scholz y col. 1994; Thomas y col. 1994), ha sido posible poner de manifiesto la existencia de una considerable variabilidad dentro de taxones particulares. Sin embargo, pocos de esos

métodos son apropiados cuando se requiere conocer la diversidad genética y estructura de las poblaciones bacterianas.

Tanto en la bacteriología moderna, como en los estudios sobre genética de poblaciones se enfatiza en la necesidad de analizar muestras representativas de bacterias aisladas de su ambiente natural (Hartl y col. 1986), por lo que es necesario contar con métodos eficientes para el análisis de la diversidad y estructura genética de las poblaciones.

Actualmente, los métodos, la teoría y los análisis estadísticos de la biología de poblaciones de plantas y animales se aplican a los estudios de la genética de poblaciones bacterianas, principal y notablemente mediante el uso de la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) (ver referencias de la Tabla 1). También, cada vez con mayor frecuencia, se recurre al análisis de los perfiles de RFLPs (Nei, 1987).

Las primeras aplicaciones microbiológicas de la electroforesis de enzimas fué inicialmente dirigida a la identificación de cepas bacterianas durante la década de los '60s (Cann y Wilcox, 1965; Lund, 1965) y aún en fechas recientes ha sido usada con fines taxonómicos (Goulet, 1980; Goulet, 1984; O'Brien y col. 1981; Yamada y Akita, 1984; Zahner y col. 1989). Sin embargo, la mejor y más completa aplicación a ésta metodología ha sido su incorporación a los estudios de la genética de poblaciones bacterianas (Milkman, 1973). Selander y colaboradores han generado muy amplios conocimientos sobre la diversidad genética y estructura de las poblaciones bacterianas. Aspectos históricos, conceptuales y metodológicos pueden ser consultados en una excelente (mini)revisión sobre el tema (Selander y col. 1986a).

Con el método de MLEE las variantes de movilidad electroforética de una enzima (electromorfos o aloenzimas) pueden relacionarse con la variación alélica en genes estructurales específicos (Selander y col. 1986a). Esto hace posible la identificación de alelos múltiples en un número elevado de genes, en un igualmente

elevado número de aislamientos bacterianos. Generalmente es aceptado que las aloenzimas analizadas son codificadas por el cromosoma. Sin embargo, es necesario ser cautelosos al emplear este método en especies donde una fracción importante del genoma corresponda a DNA plasmídico. Estudios recientes demuestran claramente que una deshidrogenasa (no identificada), así como una β -galactosidasa inducible son codificadas, respectivamente, en los megaplásmidos pRmeSU47a y pRmeSU47b presentes en *Rhizobium meliloti* (Charles y col. 1990). De manera similar, en *R. leguminosarum* bv. trifolii se ha observado (Baldani y col. 1992) que la curación de un plásmido influyó en la pérdida de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, hexoquinasa y carbamato quinasa. De hecho, Charles y col. (1990), sugieren la conveniencia de reevaluar los estudios de la genética de la población de *R. leguminosarum* realizados por Young y Wexler (1988), donde la β -galactosidasa fue usada como un marcador cromosomal. Por otra parte, las estimaciones de la distancia genética, derivada de los estudios de MLEE, se ha correlacionado directamente con las estimaciones de la divergencia de secuencias de nucleótidos obtenidas de la hibridación del DNA en muy diversas especies bacterianas (Gilmour y col. 1987; Leung y col. 1994; Ochman y col. 1983; Segovia y col. 1991; Selander y col. 1985; Yamada y Akita, 1984). Los dendogramas generados por MLEE, concuerdan generalmente con los árboles filogenéticos basados en el análisis de secuencias nucleotídicas (Milkman y Bridges, 1990; Nelson y col. 1991).

El análisis de los patrones de RFLPs, obtenidos por la digestión del DNA con enzimas de restricción permite determinar la variación genética dentro de regiones definidas del genoma, aún entre organismos íntimamente relacionados. Esto se debe a que aún pequeños cambios en la organización del DNA pueden modificar los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, disminuyendo entonces la proporción de sitios (o fragmentos) compartidos entre los organismos conforme las secuencias nucleotídicas sean divergentes (Nei y Li, 1979). La variación puede ser

examinada sobre pequeñas (unas pocas pares de bases) o grandes (30-40 kilobases) extensiones del DNA, dependiendo del nivel de detección polimórfico deseado. La variación genética puede ser observada en un organismo sobre secuencias aleatorias (fragmentos de DNA de función desconocida) ó secuencias blanco seleccionadas (genes conocidos) y comparadas contra un fondo genómico de otro organismo.

El método de RFLPs tiene la ventaja sobre el método de MLEE, en que permite analizar cualquier parte del genoma, sin importar la capacidad de codificación o expresión de una proteína específica (Denny y col. 1988).

En estudios realizados sobre diversas especies bacterianas, mediante el uso de RFLPs o MLEE, se han observado niveles de agrupación que oscilan desde grupos con características fenotípicas y genotípicas esencialmente idénticas, hasta grupos que muestran gran variabilidad.

Notablemente, las poblaciones bacterianas con los más bajos niveles de variabilidad genética, se encuentran en las especies bacterianas intracelulares del grupo de las rickettsias (Fuerst y col. 1990) y *Mycobacterium leprae* (Clark-Curtiss y Walsh, 1989; Grosskinsky y col. 1989). *Yersinia ruckeri* (Schill y col. 1984), *Salmonella* spp. (Selander y col. 1990) y *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Denny y col. 1988) muestran una diversidad genética tan baja como 0.014, 0.093 y 0.179, respectivamente. El nivel más alto de diversidad genética (0.849) se observa entre las especies de los Streptococci orales (Gilmour y col. 1987). Exceptuando el caso anterior, los niveles más altos de variabilidad genética conocidos entre las poblaciones bacterianas (en el rango de 0.529-0.70) se encuentran entre los microorganismos del suelo (algunos de los cuales viven en alternancia asociados con plantas) incluyendo a los géneros *Bacillus* (Carlson y col. 1994), *Rhizobium* (Leung y col. 1994; Piñero y col. 1988), *Bradyrhizobium* (Bottomley y col. 1994) y *Pseudomonas* (McArthur, 1988). Entre éstos dos niveles de diversidad se encuentran los de muchas de las especies bacterianas (ver Tabla 1). Sin embargo, la mayoría de

las comunidades microbianas no han sido analizadas (Margulis y col. 1986).

Ya en la década de los '70s se habían acumulado una gran cantidad de evidencias circunstanciales indicando la relación entre polimorfismo genético en eucariotes y heterogeneidad ambiental (Hedrick y col. 1976). Aún en la actualidad son escasas las evidencias experimentales que correlacionan las condiciones o fuerzas selectivas con la diversidad genética observada en las poblaciones bacterianas.

Los niveles de diversidad genética observados en las poblaciones bacterianas se han relacionado con la especialización de hospedero (Denny y col. 1988; Selander y col. 1985), en el cual podrían incorporarse los sitios de domesticación de plantas hospederas de algunas poblaciones bacterianas (Souza y col. 1994), así como otros factores ecológicos (McArthur y col. 1988; Selander y col. 1985), tamaño de la población efectiva, probablemente en relación con el tiempo de origen evolutivo (Clark-Curtiss y Walsh, 1989; Musser y col. 1986; Musser y col. 1987a;) y con la recombinación en escalas locales (Bottomley y col. 1994; Istock y col. 1992; Souza y col. 1992; Souza y col. 1994). Muy probablemente la diversidad de las poblaciones, a través del tiempo evolutivo, no es influenciada por un sólo factor, sino que es influenciada por la alternancia de estos factores de acuerdo a las presiones selectivas existentes.

Aún cuando la información es limitada, se ha observado una estrecha relación entre la diversidad de hospedero y el nivel de variación genética de diferentes especies bacterianas patógenas de plantas. El análisis de 93 cepas de *Xanthomonas campestris* (Lazo y col. 1987), representando 26 patovares, muestra que el más alto nivel de polimorfismo de los patrones de restricción del DNA se observó en los patovares con amplio rango de hospedero, en tanto que los de estrecho rango exhibieron poco polimorfismo. En forma análoga, en *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* se observó un alto nivel de homogeneidad genética en los patrones de RFLPs

correspondientes a los genes *hrp* (genes de la reacción de hipersensibilidad y patogenicidad), indicando que el rango de hospedero se correlacionó con el alto nivel de homogeneidad genética bacteriana (Scholz y col. 1994). En esta misma especie se puede observar aún con mayor claridad la estrecha relación que existe entre diversidad bacteriana y variabilidad de hospedero, ya que *P.s. pv. syringae*, la cual es patógena de varios hospederos, muestra una diversidad genética de 0.479, mientras que en el pv. tomate, con un solo hospedero, el nivel de diversidad genética es tan sólo 0.179 (Denny y col. 1988).

Se ha sugerido que la variabilidad de un grupo bacteriano depende del habitat o habitats del cual los individuos fueron aislados, de tal manera que los grupos que muestran una escasa diversidad genética parecen ocupar nichos ecológicos muy específicos, en tanto que los grupos con gran diversidad ocupan varios nichos ó estos son variables (Hildebrand y col. 1982).

Si bien, la sugerencia anterior no se ajusta para explicar el nivel de diversidad genética observado en todas las poblaciones estudiadas, al menos parece contribuir en forma importante para algunas de ellas. Este puede ser el caso, entre otros, de las bacterias intracelulares patógenas del hombre y/o animales de los géneros *Rickettsia* y *Mycobacterium*, las cuales viven bajo condiciones relativamente constantes. Factores como la concentración y disponibilidad de nutrientes, pH y temperatura, los cuales actúan como agentes selectivos sobre los genes que controlan los sistemas enzimáticos (McArthur y col. 1988), probablemente sólo ejerzan ligeros cambios adaptativos dada la relativa constancia de estos factores en el interior de las células y en consecuencia una escasa variabilidad. En contraste, puede observarse que especies del género *Bacillus* (Carlson y col. 1994) y *Azospirillum* (Fani y col. 1991; López-Reyes y col. 1989; Plazinski y col. 1983), que habitan en un ambiente altamente variable como el suelo, con amplias fluctuaciones en concentración y disponibilidad de nutrientes (orgánicos y minerales), temperatura, pH y humedad,

entre otros factores, muestran una amplia variabilidad. Al respecto, resultados experimentales (McArthur y col. 1988) han mostrado que la diversidad genética de *Pseudomonas cepacia*, bacteria comunmente aislada del suelo, está correlacionada con la variabilidad ambiental. También en el caso de *Bacillus polymyxa* se observa que la diversidad de las cepas depende del origen de aislamiento (Mavingui y col. 1992), observándose que las cepas aisladas del suelo y de la rizosfera son más altamente variables que las cepas aisladas de rizoplano, las cuales muestran un muy bajo nivel de diversidad entre ellas.

En otro ambiente diferente al suelo parece ocurrir una situación similar. Por ejemplo, la diversidad genética observada entre cepas de *Klebsiella oxytoca*, aisladas de expectoraciones, orina, sangre y otras fuentes clínicas, es del orden de 0.673 (Combe, y col. 1994), en tanto que la población de *K. oxytoca*, aislada exclusivamente del bulbo esofágico de la mosca de la fruta del género *Rhagoletis*, presentan un nivel de diversidad genética de 0.486 (Howard y col. 1985). Estos resultados sugieren que aún cuando los factores ambientales pueden ser relativamente constantes en el interior de un hospedero, las condiciones del microambiente (e.g., pH, cantidad y calidad de nutrientes en orina, sangre, bulbo esofágico, etc.), parecen jugar un papel importante en la diversidad bacteriana.

Se ha observado una gran variabilidad también en la bacteria del suelo simbiote del frijol, *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli tipo I [actualmente *R. etli* bv. phaseoli (Segovia y col. 1993)], encontrándose perfiles genómicos únicos en cada cepa entre las muchas analizadas (Flores y col. 1988), y una diversidad genética tan alta como 0.691 (Piñero y col. 1988). También se observó que entre 193 cepas de *R. leguminosarum* bv. viceae, agrupadas en diferentes serogrupos, existe una alta diversidad en perfiles de plásmidos y resistencia a los antibióticos (Brockman y Bezdicek, 1989). Sin embargo, en poblaciones de *R. leguminosarum* bv. trifolii se han encontrado evidencias de intercambio genético y recombinación

de plásmidos (Schofield y col. 1987) y recientemente ha sido descrita la existencia de recombinación genética en escalas locales en *R. etli* (Souza y col. 1994), por lo cual es difícil determinar, al menos en la actualidad, si la elevada diversidad genética observada en esta última especie es producto de las variables ambientales, de la recombinación existente, o bien de estas y otras causas.

Muy informativo e interesante sería el determinar si la escasa diversidad genética existente en las especies bacterianas intracelulares arriba citadas, se presenta también en la bacteria intracelular *Brucella abortus*, o esta bacteria es tan variable genéticamente como el género *Rhizobium* con el cual está estrechamente relacionada (Moreno y col. 1990; Willems y Collins, 1993). Igualmente informativo sería conocer el nivel de diversidad genética en las poblaciones bacterianas predominante o estrictamente endófitas como *A. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* (Pimentel y col. 1991) y *Azoarcus* (Reinhold-Hurek y col. 1993), considerando que son poblaciones que viven bajo condiciones ambientales relativamente constantes.

El otro aspecto relevante de la biología de las poblaciones bacterianas es la estructura genética de la población. Gran parte del conocimiento obtenido, como anteriormente fué señalado, ha sido mediante el uso del método de MLEE. Generalmente se considera que los genotipos electroforéticos caracterizan clonas, porque la convergencia evolutiva en un mismo genotipo multilocus es altamente improbable (Selander y col. 1985; Selander y Levin, 1980).

En muchas de las investigaciones realizadas se ha concluído que las poblaciones de muy diversas especies bacterianas tienen una estructura genética básicamente clonal (ver referencias en Tabla 1; Gabriel y col. 1988). Los resultados obtenidos durante los últimos 20 años son testimonio de que la clonalidad es actualmente el modelo dominante, existiendo muy pocas excepciones (Istock y col. 1992; Maynard Smith y col. 1991; O'Rourke y Stevens, 1993; Souza y col. 1992).

Una estructura de población clonal se caracteriza por la existencia de un fuerte

desequilibrio de ligamiento (asociación no aleatoria de alelos) (Brown y Feldman, 1981; Caugant y col. 1981), indicando que existe una restringida recombinación entre alelos en diferentes loci. Esta conclusión surge al observar que las combinaciones de alelos en diferentes loci se encuentran en frecuencias muy diferentes de las esperadas, simplemente por multiplicar entre sí las frecuencias de los alelos relevantes (Hartl y col. 1986; Whittam y col, 1983), es decir, solamente una pequeña fracción de todos los genotipos posibles son detectados.

Una estructura clonal también ha sido deducida de la distribución global de un genotipo. Frecuentemente esta característica es considerada como la más fuerte y significativa evidencia de reproducción clonal (Tibayrenc y col. 1991). En opinión de estos autores, la evidencia de clonalidad es particularmente significativa cuando un mismo genotipo es detectado en exceso (sobre-representado) en diferentes y distantes áreas geográficas, o en muestras tomadas en diferentes tiempos.

La composición genotípica de las poblaciones puede variar geográfica y temporalmente, por lo que genotipos detectados en altas frecuencias en una región geográfica en un tiempo, pueden estar ausentes o no ser detectables en otras regiones (O'Rourke y Stevens, 1993). Recientemente se ha considerado que el aislamiento temporal y geográfico en *R. etli* (Souza y col. 1992; Souza y col. 1994) y el ecológico en *N. gonorrhoeae* (O'Rourke y Stevens, 1994), pueden contribuir al desequilibrio de ligamiento a pesar de la recombinación. Lo anterior significa que aún cuando la recombinación ocurra, el aislamiento por distancia o la baja densidad de población puede imponer una estructura clonal en poblaciones locales de bacterias, debido a la reducida frecuencia de "encuentro" entre los diferentes genotipos. Así, una elevada frecuencia de fisión binaria, respecto a la recombinación, conducirá a una estructura de población clonal. De hecho, la "reproducción por fisión binaria establece necesariamente una estructura genotípica clonal" (Istock y col. 1992), por lo que las poblaciones bacterianas deberán mostrar un cierto grado de

clonalidad que dependerá de la frecuencia de recombinación existente. Tal recombinación puede alcanzarse mediante algunos mecanismos parasexuales presentes en las bacterias, incluyéndose en éstos la transducción, conjugación y la transformación (Lorenz y Wackernagel, 1994). Evidencias derivadas de la comparación de secuencias nucleotídicas sugieren la existencia de recombinación localizada en *E. coli* (Dykhuizen y Green, 1991; Milkman y Bridges, 1990), pero la amplitud de transferencia de material genético ha sido considerada insuficiente para romper la estructura clonal de las poblaciones de esta bacteria (Levin, 1981; Whittam y col. 1983b), debido a que frecuentemente el intercambio en regiones localizadas del genoma involucra sólo unos pocos cientos de pares de bases (Maynard Smith y col. 1991).

Los valores de diversidad genética, derivados de datos electroforéticos, indican que las bacterias que son naturalmente competentes para transformación, tales como las Gram positivas *Bacillus-Streptococcus* y las Gram negativas *Haemophilus-Neisseria*, son genéticamente más variables que las bacterias no transformables (Selander y col. 1987). Por ejemplo (ver Tabla 1) los niveles de diversidad genética en las poblaciones de *Streptococcus* son los más elevados (0.857) entre las poblaciones bacterianas estudiadas (Gilmour y col. 1987), siendo los niveles en *Neisseria meningitidis* mayores que los de muchas otras especies analizadas (Caugant y col. 1987). Sin embargo, la capacidad de transformación *per se* no necesariamente implica recombinación extensiva, ya que *H. influenzae* es también transformable, pero las evidencias de recombinación frecuente son escasas (Maynard Smith y col. 1993). Estudios recientes han proporcionado, mediante datos electroforéticos y/o análisis de secuencias, evidencias de recombinación en *N. meningitidis* (Caugant y col. 1986a; Zhou y Spratt, 1992) y *Streptococcus* (Maynard Smith y col. 1991). También recientemente se ha descrito que el desequilibrio de ligamiento puede ser mínimo dentro de poblaciones locales de *Rhizobium etli* (Souza y col. 1992), *R.*

leguminosarum biovar *trifolii* (Leung y col. 1994), *Bradyrhizobium* sp. (Bottomley y col. 1994) y de *Bacillus subtilis* (Istock y col. 1992), así como en poblaciones globales de *N. gonorrhoeae* (Maynard Smith y col. 1991; O'Rourke y Stevens, 1994). Estos hallazgos indican que la sexualidad en estas especies y probablemente en muchas otras no analizadas al respecto, puede ser lo suficientemente frecuente a nivel local o global como para reducir o romper la estructura de población clonal.

El análisis estadístico de datos electroforéticos obtenidos en diferentes especies bacterianas, revela que la estructura de poblaciones puede extenderse desde la estrictamente clonal, como en el caso de poblaciones similares a *Salmonella*, hasta panmícticas, las cuales son altamente sexuales, como ocurre en *N. gonorrhoeae* (Maynard Smith y col. 1993). Estos autores encontraron dentro de ésta escala 2 tipos intermedios de estructura de poblaciones: 1) aquellas poblaciones similares a *Rhizobium* las cuales son sexuales en escalas locales pero no recombinan entre poblaciones; 2) aquellas a las que se propone llamarlas epidémicas tal como las poblaciones de *N. meningitidis*, las cuales son panmíctica durante largos períodos de tiempo, surgiendo ocasionalmente un genotipo altamente exitoso que se disemina rápidamente y origina un cierto grado de clonalidad, continuando posteriormente con nuevas recombinaciones.

Si bien es cierto que la clonalidad es actualmente el paradigma dominante, también resulta evidente que los resultados obtenidos en los últimos 2 años (citados antes), conducen a replantear el conocimiento actual de la estructura genética de las poblaciones bacterianas.

Actualmente se considera que la variación genética y la evolución de las poblaciones bacterianas es influenciada por los efectos de mutación, selección y recombinación, así como por las interacciones del cromosoma, plásmidos y elementos transponibles (Coplin, 1989; Hartl y col. 1986). Desde un punto de vista evolutivo se concibe que el cromosoma evoluciona en forma relativamente lenta bajo

tales efectos, en tanto que los plásmidos son considerados como agentes de rápido cambio evolutivo, a través de un amplio rango de géneros y especies (Hartl y col. 1986).

En la mayoría de las poblaciones bacterianas asociadas a plantas se ha observado, aún entre cepas de una misma especie, una gran diversidad de perfiles de plásmidos (Bender y Cooksey, 1986; Coplin y col. 1981; Martínez y Palacios, 1984 ; Mozo y col. 1988; Vázquez-Cruz y col. 1992) y también una gran diversidad de funciones codificadas por ellos. Algunos genes contenidos en los plásmidos están relacionados con las funciones del mismo, tal como la formación del pili o la transferencia del plásmido durante la conjugación (Hartl y col. 1986). Otros genes están relacionados con el metabolismo de la bacteria hospedera, por ejemplo, los que determinan la resistencia a los antibióticos, o aquellos responsables de la fijación de N₂ en diazótrofos de vida libre como *Enterobacter agglomerans* (Singh y col. 1983) y *Lignobacter* (Derylo y col. 1981). Otros más están relacionados con algunas actividades microbianas que influyen en el desarrollo de las plantas, entre éstos, los genes para la biosíntesis de ácido indol acético en *A. tumefaciens* (Liu y col., 1982) y en *Pseudomonas savastanoi* (Comai and Kosuge, 1980). En diferentes especies de *Rhizobium*, las actividades de fijación del dinitrógeno, así como la nodulación, también provienen de genes localizados en plásmidos de alto peso molecular (Martínez y col. 1990).

Evidencias de intercambio de material genético entre especies de bacterias han sido documentadas en diversas revisiones (DeFlaun y Levy, 1989; Farrand, 1989), existiendo poca duda de que las poblaciones bacterianas han adquirido algunos genes mediante la transferencia lateral de plásmidos, por lo que este DNA exógeno podría contribuir a la variación genética en estos organismos (Krawiec and Riley, 1990).

Tabla 1. Diversidad genética en especies bacterianas

Organismo	No. de ETs ^a	H ^b	Estructura de Población	Referencia
<i>Bacillus</i> spp.	27 ^c	0.556	N.A.	20
<i>B. cereus</i>	18	0.529		
<i>B. thuringiensis</i>	10	0.550		
<i>Bacillus subtilis</i>	55	0.440	No clonal ^d	73
<i>Bordetella</i> spp.	14	0.284	Clonal	110
<i>B. bronchiseptica</i>	10	0.277		
<i>B. parapertusis</i>	1	0.000		
<i>B. pertusis</i>	3	0.133		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	21	0.248	Clonal	108
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	17	0.690	No clonal ^d	14
<i>Escherichia coli</i>				
de humanos y animales		0.417	Clonal	152
de orina y heces diferentes fuentes	302	0.520	Clonal	172
de septicemia neonatal y meningitis	39	0.369	Clonal	151
<i>Haemophilus influenzae</i>				
serotipo b	32	0.342	Clonal	109
diversos serotipos	280	0.467	Clonal	111
<i>Haemophilus pleuropneumoniae</i>	32	0.428	Clonal	112
<i>Klebsiella</i> spp. (fuentes clínicas)	57	0.605	Clonal	30
<i>K. pneumoniae</i>	34	0.559		
<i>K. oxytoca</i>	23	0.673		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	18	0.486	Clonal	70
de mosca de la fruta				

(continuación)

Tabla 1. Diversidad genética en especies bacterianas

Organismo	No. de ETs ^a	H ^b	Estructura de Población	Referencia
<i>Legionella pneumophila</i>	62	0.413	Clonal	153
<i>L. pneumophila (sensu stricto)</i>	50	0.312		
"especie 1"	9	0.182		
"especie 2"	3	0.061		
<i>Listeria monocytogenes</i>				
245 cepas diversas fuentes, (12 loci)	33	0.303	Clonal	117
181 cepas diversas fuentes, (21 loci)	50	0.415	Clonal	11
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	89	0.410	No clonal ^d	123
<i>Neisseria meningitidis</i>				
460 cepas (15 loci)	192	0.536	Clonal	22
152 cepas (9 loci)	55	0.615	N.A. ^c	21
<i>Pseudomonas cepacia</i>		0.54-0.70	N.A.	99
<i>Pseudomonas syringae</i>	10	0.683	N.A.	37
<i>P. s. pv. syringae</i>	6	0.479		
<i>P. s. pv. tomato</i>	4	0.179		
<i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli		0.487	No clonal ^d	155
<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli				
Cepas simbióticas	38	0.615	Clonal	128
Cepas no simbióticas	38	0.504	Clonal	146
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii			Clonal	79
Cepas de una localidad	53	0.460	No clonal ^d	
Cepas diversos orígenes	29	0.570		
<i>Salmonella</i> spp.	71	0.255	Clonal	7
8 especies; diferentes hospederos				

(continuación)

Tabla 1. Diversidad genética en especies bacterianas

Organismo	No. de ETs ^a	H ^b	Estructura de Población	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.			Clonal	148
7 serotipos asociados a humanos	54	0.093		
9 serotipos asociados a animales	83	0.172		
<i>Serratia marcescens</i>	33	0.376	Clonal	55
Cepas cromogénicas	23	0.294		
Cepas no cromogénicas	10	0.293		
<i>Streptococcus</i> spp.	40	0.857	N.A. ^c	58
Streptococci orales complejo mutans	18	0.849		
Streptococci orales complejo sanguis	22	0.726		
<i>Yersinia ruckeri</i>	4	0.014	clonal	139

^aETs = tipos electroforéticos

^bH = media de la diversidad genética por locus

^cCepas de ambas especies pertenecen a un mismo ET

^dSe determinaron niveles variables de desequilibrio de ligamiento

^eExisten evidencias de recombinación genética

N.A.: no analizada

ANTECEDENTES

Como se indicó en párrafos anteriores, "el estudio sistemático de un taxon bacteriano particular se inicia con su aislamiento en cultivo puro". Así, el estudio de *Acetobacter diazotrophicus* fue iniciado en nuestro país con el aislamiento de esta bacteria del interior de raíces y tallos de 11 diferentes variedades de caña (9 Mexicanas, 1 Cubana y 1 de Florida, USA), cultivadas en diversas regiones de México distantes entre sí hasta en 500 Km. Todas estas cepas, además de llevar a cabo la fijación de nitrógeno presentaron características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas comunes a la cepa tipo de *A. diazotrophicus* PA1 5^T (ATCC 49037) y a las cepas de referencia PPe4 (ATCC 49038) y PR2 (ATCC 49039).

Las características de estas cepas y otros aspectos relevantes de la asociación caña de azúcar-*A. diazotrophicus* se reportaron en el trabajo:

Acetobacter diazotrophicus, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* **154**:145-150. 1993. Este se incluye en el Anexo 1.

TRABAJO EXPERIMENTAL

El trabajo que se presenta como tesis fue desarrollado en 2 fases.

PRIMERA FASE

En esta fase se llevó a cabo la caracterización genética de 21 cepas de *A. diazotrophicus*, recobradas exclusivamente de diferentes variedades de caña de azúcar cultivada en diversas regiones cañeras de México, así como de 3 cepas aisladas en Brasil.

SEGUNDA FASE

En esta fase se ampliaron los estudios sobre la diversidad y estructura genética de *A. diazotrophicus*, analizando 55 cepas aisladas de caña de azúcar, camote y pasto Camerun (*Pennisetum purpureum*), así como del insecto *Saccharicoccus sacchari*, colectados en su mayoría en diferentes áreas geográficas de México y Brasil y solamente algunas cepas aisladas en Australia y Uruguay.

JUSTIFICACION

Debido a las capacidades de *A. diazotrophicus* de fijar N_2 aún en presencia de nitrógeno combinado (Stephan y col. 1991), así como para excretar casi el 50% del nitrógeno fijado (Cojho y col. 1992) y para producir sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Fuentes-Ramírez y col. 1993), esta bacteria resulta de particular interés por su uso potencial en biotecnología agrícola. Además, debido a que el desarrollo de una biotecnología exitosa puede ser facilitado por la caracterización y el entendimiento de las poblaciones naturales de bacterias útiles (Souza y col. 1994), resulta conveniente el conocer la diversidad y estructura genética de *Acetobacter diazotrophicus*.

PRIMERA FASE

OBJETIVOS

1. Determinar la presencia o ausencia de plásmidos en *A. diazotrophicus*.
2. Determinar si las funciones de fijación de N₂ y biosíntesis de ácido indol acético están codificadas por genes plasmídicos o cromosomales.
3. Analizar la variabilidad genética de la bacteria en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados y el análisis de los mismos están incluidos en el trabajo:
Limited Genetic Diversity in the Endophytic Sugarcane Bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Environ. Microbiol. **60**:1532-1537. 1994. Este se presenta a continuación.

Limited Genetic Diversity in the Endophytic Sugarcane Bacterium *Acetobacter diazotrophicus*

JESUS CABALLERO-MELLADO AND ESPERANZA MARTINEZ-ROMERO*

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 15 November 1993/Accepted 10 February 1994

Acetobacter diazotrophicus isolates that originated from different sugarcane cultivars growing in diverse geographic regions of Mexico and Brazil were shown to have limited genetic diversity. Measurements of polymorphism in the electrophoretic mobilities of metabolic enzymes revealed that the mean genetic diversity per enzyme locus (among the four electrophoretic types distinguished) was 0.064. The results of the genetic analysis indicate that the genetic structure of *A. diazotrophicus* is clonal, with one largely predominant clone. Plasmids were present in 20 of 24 isolates, and the molecular sizes of the plasmids ranged from 2.0 to 170 kb. Two plasmids (a 20- to 24-kb plasmid detected in all 20 plasmid-containing isolates and a 170-kb plasmid observed in 14 isolates) were highly conserved among the isolates examined. Regardless of the presence of plasmids, all of the isolates shared a common pattern of *nif* structural gene organization on the chromosome.

Considerable variability exists within individual soil bacterial species, including members of the genera *Azospirillum* (10, 28), *Bacillus* (21), *Bradyrhizobium* (33, 41), and *Rhizobium* (12, 27). An analysis of the genetic structures of populations, as estimated by allele frequencies and multilocus genotypes, revealed high levels of genetic diversity in *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli (27) and in the soil bacterium *Pseudomonas cepacia*. In *Pseudomonas cepacia* the diversity was correlated with soil environment variability (22). The levels of genetic diversity in species of bacteria may be related to habitat. Less variability has been observed in *Escherichia coli* (38), *Haemophilus influenzae* (23), *Yersinia ruckeri* (32), and *Pasteurella piscicida* (18), bacteria that predominantly or exclusively live under constant conditions inside organisms.

Over the last few years there has been great interest in plant-associated bacteria. Research to improve crop responses has emphasized the study of nitrogen-fixing bacteria indigenous to the rhizosphere, but little is known about nonrhizosphere nitrogen-fixing bacterial populations associated with plants. Recently, *Acetobacter diazotrophicus*, an N_2 -fixing bacterium, has been isolated from sugarcane roots and stems (5, 13, 16). This species has also been recovered from both *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon and sweet potato (8), as well as from different genera of mealybugs associated with sugarcane plants (1). In this paper we report that there is limited genetic diversity among isolates of *A. diazotrophicus* recovered from sugarcane plants growing in diverse geographic regions of Mexico and Brazil, and we also show that this species harbors highly conserved small and large plasmids.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The strains of *A. diazotrophicus* which we used were isolated from the inside tissues of stems or roots of sugarcane plants cultivated in diverse geographic regions of Mexico (13). Only isolates recovered from different plants were considered to be different. These strains were maintained

in 10% glycerol at -70°C . Brazilian strains PAI 5^T (= ATCC 49037^T) (T = type strain), PPe 4 (= ATCC 49038), and PR 2 (= ATCC 49039) were kindly supplied by J. Döbereiner. *E. coli* HB101 (11) and GO 102 (9), the latter kindly supplied by R. B. Gennis, and *Rhizobium etli* CFN 42 (34) were used as described below.

Media and cultural conditions. SYP medium (1.0% sucrose, 0.1% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.3% KH_2PO_4 ; pH 6.2) was used to grow *A. diazotrophicus* isolates. *E. coli* strains were grown in Luria broth. *R. etli* CFN 42 was grown in peptone-yeast extract liquid medium (25). The incubation temperature used was 29°C , and the cultures were shaken at 200 rpm.

Multilocus enzyme electrophoresis. Cultures grown for 36 h in 40 ml of SYP medium were harvested by centrifugation at $12,300 \times g$ for 10 min at 4°C , and the resulting preparations were suspended in 0.3 ml of 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ containing 300 μg of lysozyme and incubated for 10 min at room temperature. Each suspension was frozen at -70°C for 15 min and defrosted; then the process was repeated. Lysates were stored at -70°C .

The procedures used for starch gel electrophoresis and selective staining of enzymes have been described previously by Selander et al. (37). The following 11 metabolic enzyme activities were assayed: alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, xanthine dehydrogenase, lysine dehydrogenase, leucine dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, indophenol oxidase (superoxide dismutase), glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphoglucosmutase, hexokinase, and esterases. The buffer system used was Tris-citrate (pH 8.0). The electrophoretic mobility of each enzyme was determined three times. Distinctive combinations of alleles for the 11 enzyme loci (multilocus genotypes) were designated different electrophoretic types (ETs) (37). The ET was determined for each isolate. The level of genetic diversity for each enzyme locus was calculated as described previously (37).

Total-DNA isolation and DNA restriction. Total DNA was isolated as described previously (2). DNA was digested with restriction endonuclease *EcoRI*. Total-DNA restriction fragments were electrophoresed in vertical 1.0% agarose gels in Tris-acetate buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA; pH 8) at 40 V for 13 h at 4°C . The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV illumination.

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Ap.P. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (73) 13-16-97. Fax: (73) 17-55-81. Electronic mail address: esperanza@n2.cefini.unam.mx.

TABLE 1. Genetic diversity at 11 enzyme loci

Enzyme locus ^a	No. of alleles	Genetic diversity ^b
ADH	1	0.000
MDH	1	0.000
XDH	1	0.000
LYD	1	0.000
LED	1	0.000
IDH	2	0.106
IPO	1	0.000
G6P	2	0.203
PGM	1	0.000
HEX	2	0.106
EST	2	0.291
Mean	1.36	0.064

^a ADH, alcohol dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; XDH, xanthine dehydrogenase; LYD, lysine dehydrogenase; LED, leucine dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; IPO, indophenol oxidase; G6P, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGM, phosphoglucosmutase; HEX, hexokinase; EST, esterases.

^b $h = 1 - \sum x_i^2 / [n(n-1)]$, where h is the genetic diversity, x_i is the frequency of the i th allele, and n is the number of ETs.

Plasmid content and electrophoresis procedure. Plasmid profiles were analyzed by the procedure of Hirsch et al. (15). Plasmid DNAs were electrophoresed in vertical 0.75% agarose gels prepared in Tris-borate buffer (45 mM Tris-borate, 2 mM EDTA; pH 8) at 120 V for 13 h. In addition, small plasmids were also identified by the alkaline lysis method (31). Small plasmids were electrophoresed for 4 h at 120 V in vertical 1.0% agarose gels prepared in Tris-acetate buffer. Electrophoresis was performed at 4°C, and bands were visualized as described above. Plasmid molecular weights were estimated by using *R. etli* CFN 42 and *E. coli* HB101(pRK2013), GO 102(pFH101),

and S17(pSUP202 carrying a 13-kb insert) as reference markers.

Plasmid and DNA hybridization. Total-DNA digests or plasmids were transferred from gels to nylon filters by the Southern procedure (40). Individual *A. diazotrophicus* plasmids from Brazilian strain PR 2 were purified from agarose gels with GeneClean (Bio 101, Inc., La Jolla, Calif.) and used as probes. To localize the *nif* genes of *A. diazotrophicus*, filters were hybridized with pCO12, which contains a 4.1-kb segment of the *nifHDK* region of *R. etli* CFN 42 (29). ³²P-labelled probes were prepared by nick translation (31), and the DNA-DNA hybridization procedure was performed as described previously (20).

RESULTS

Multilocus enzyme electrophoresis. Of the 11 metabolic enzymes assayed, 4 were polymorphic with only two alleles per locus (Table 1). Four distinctive ETs were identified among the 24 *A. diazotrophicus* isolates studied (Table 2), and the mean level of genetic diversity for the 11 enzyme loci was found to be 0.064 (Table 1). According to Selander et al. (35, 36), ETs mark clones; if a particular clone differs from the most frequent clone at a single gene locus, then it is called a subclone. We observed only four ETs. ET 1 represented 18 of the 24 isolates (75%), including Brazilian isolate PR 2. ET 1 and ET 4 represented two clones, while ET 2 and ET 3 were considered two subclones of the predominant clone, clone ET 1 (Table 1). Clones ET 1 and ET 4 differed in alleles at two enzyme gene loci (isocitrate dehydrogenase and hexokinase). Subclones ET 2 and ET 3 differed from ET 1 at the esterase and glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme loci, respectively.

The genetic relationships among the four ETs are illustrated by a dendrogram in Fig. 1. Predominant clone ET 1 is widely distributed; it was recovered from 11 different sugarcane

TABLE 2. Origins of *A. diazotrophicus* strains, ETs, DNA patterns, and numbers and sizes of plasmids

Sugarcane cultivar	Strain	ET	DNA pattern	No. of plasmids	Plasmid size(s) (kb)
— ^a	PR 2	I	I	2	170, 24
MEX 57 473	UAP 5701	I	I	2	170, 24
MEX 57 473	UAP 5702	I	I	2	170, 24
CP 72 2086	UAP 7210	I	I	2	170, 24
MEX 69 290	UAP 6925	I	I	2	170, 24
MEX 69 290	UAP 6926	I	I	2	170, 24
Cristal	UAP 0030	I	I	2	170, 24
MEX 79 546	UAP 7936	I	I	2	170, 24
Z MEX 55 32	UAP 5560	I	I	2	170, 24
MEX 52 17	UAP 5275	I	I	2	170, 24
MEX 73 523	UAP 7305	I	ND ^b	2	170, 22
MEX 73 523	UAP 7306	I	ND	2	170, 22
MEX 73 523	UAP 7308	I	ND	2	170, 22
MEX 73 523	UAP 7309	I	ND	2	170, 22
MEX 56 476	UAP 5665	I	II	3	93, 22, 2.2
MEX 80 499	UAP 8070	I	II	3	93, 22, 2.2
MEX 73 523	UAP 7307	I	III	2	20, 5.5
Cristal	UAP 0020	2	IV	1	20
Cristal	UAP 0021	2	IV	1	20
MY 55 14	UAP 5540	2	IV	1	20
—	PAI 5 ^T	3	V	NV ^c	
Cristal	UAP 0050	3	VI	NV	
—	PPe 4	4	VI	NV	
MY 55 14	UAP 5541	1	VI	NV	

^a —, for cultivar information see reference 14.

^b ND, not determined.

^c NV, none visualized.

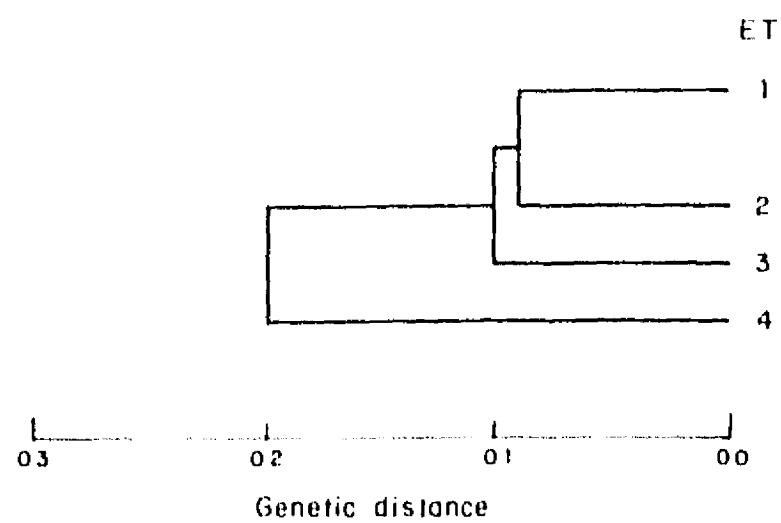


FIG. 1. Genetic relationships of four ETs identified among 24 *A. diazotrophicus* isolates recovered from sugarcane plants.

varieties cultivated in Mexico in diverse geographic regions up to 500 km apart (13). These sugarcane varieties were introduced commercially into Mexico between 1952 and 1980, as indicated by the first two numbers of each variety designation (Table 1). Brazilian isolate PR 2, which was assigned to the ET 1, was collected from sugarcane cultivated 9,000 km from Mexico (5). Subclone ET 3, represented by type strain PAI 5 of *A. diazotrophicus* and one Mexican isolate, was recovered from sugarcane plants from widely separated geographic regions. ET 4 was represented by only a single isolate (PPE4).

DNA fingerprints. An analysis of all of the *EcoRI* DNA fingerprints revealed that the patterns differed mainly in fragments ranging in size from 6.5 to 23.1 kb. Otherwise, the patterns of all of the isolates were almost identical for small fragments (less than 6.5 kb long) (data not shown). The fingerprints obtained represented six patterns (Table 2). The

majority of the isolates produced one pattern (DNA pattern I). Two other DNA patterns (patterns III and V) were each found in only a single isolate.

Plasmid patterns. Four different plasmid profiles were found, corresponding generally to ET 1 and ET 2. Most of the Mexican isolates and one Brazilian isolate contained at least two plasmids (Table 2). Fourteen isolates harbored two common, highly conserved plasmids, as revealed by agarose gel electrophoresis and hybridization assays, a large 170-kb plasmid (pAd170) and a smaller 20- to 24-kb plasmid (pAd24) (Fig. 2). Isolates UAP 5665 and UAP 8070, which were obtained from different locations and sugarcane cultivars, contained a 93-kb plasmid (pAd93) and did not contain pAd170. Plasmid pAd93 was shown to be homologous to pAd170 by hybridization assays (Fig. 2). These two isolates also harbored a small (ca. 2.0-kb) plasmid in addition to pAd24 (Fig. 3). Four isolates contained only pAd24, and one of these isolates also contained a 5.5-kb plasmid (pAd5). Four isolates, including type strain PAI 5 of *A. diazotrophicus*, did not contain any plasmids (Fig. 2). The absence of pAd24, pAd93, and pAd170 was corroborated by the lack of hybridization of DNA fingerprints when we used total DNAs from plasmidless isolates digested with *EcoRI* and hybridized with purified 24- and 170-kb plasmids from Brazilian strain PR 2 (data not shown).

nifHDK patterns. Total *EcoRI* DNA digests from *A. diazotrophicus* isolates were hybridized to *R. cili nifHDK* genes. Three common hybridizing bands (9.0, 2.0, and 1.25 kb) were found in all of the isolates examined (Fig. 4). Blots of Hirsch type gels were also hybridized to *nifHDK* genes, and the lack of hybridization signals corresponding to the plasmids was interpreted to indicate that nitrogen fixation genes were located on the chromosome (data not shown).

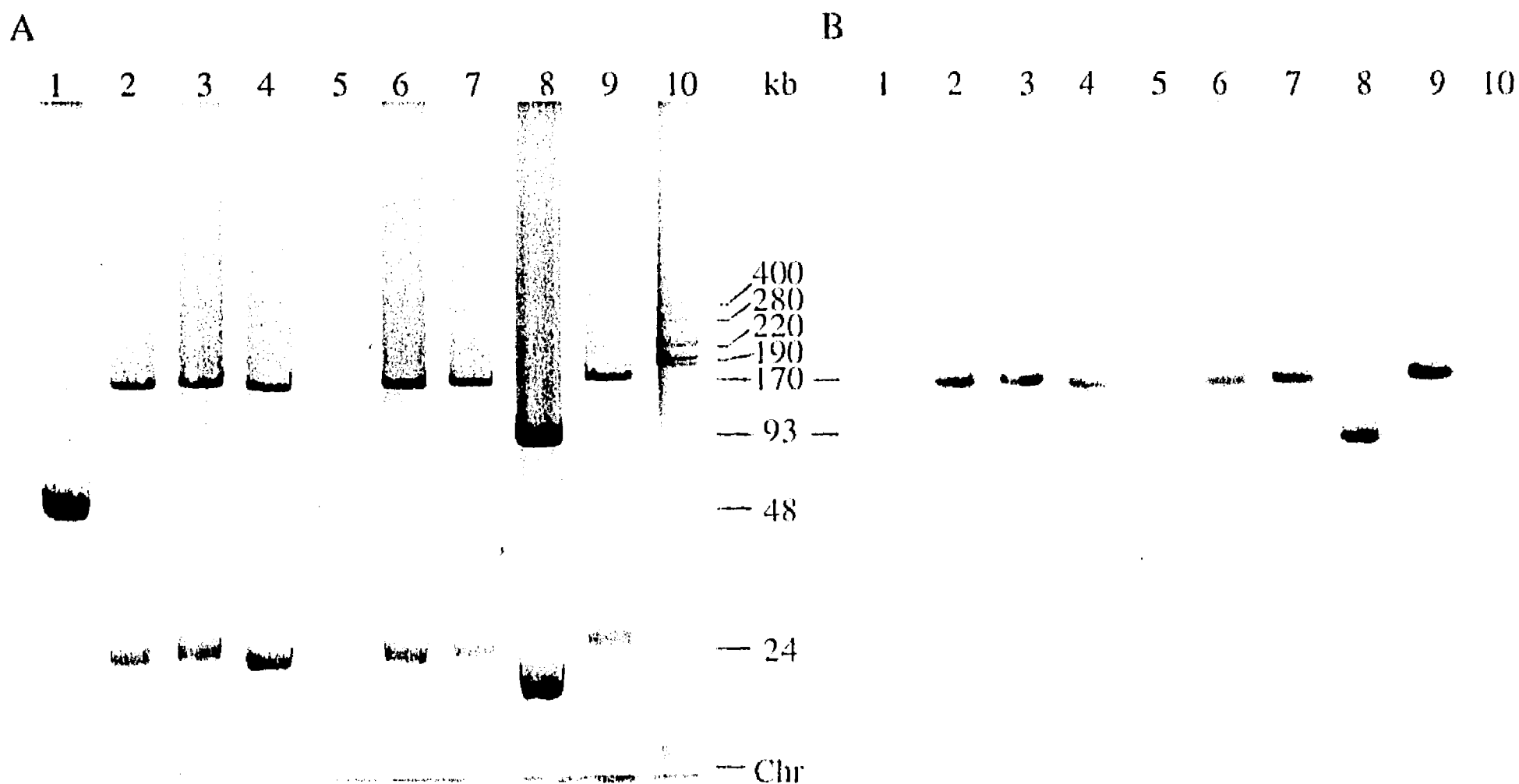


FIG. 2. (A) Agarose gel electrophoresis of plasmids obtained by the Hirsch procedure. (B) Autoradiogram of a Southern blot of the plasmid profile after hybridization with plasmid pAd170 from Brazilian isolate PR 2. Lanes 1, *E. coli* HB101 harboring pRK2013 (48 kb), used as a marker; lanes 2 through 9, *A. diazotrophicus* UAP 5701, UAP 6925, UAP 7936, PAI 5^T, PR 2, UAP 5560, UAP 5665, and UAP 5275, respectively; lanes 10, *R. cili* CFN 42 harboring plasmids a and b (190 kb), plasmid c (220 kb), plasmid d (*sym* plasmid, 280 kb), and plasmid e (400 kb), used as a marker. Chr, chromosome.

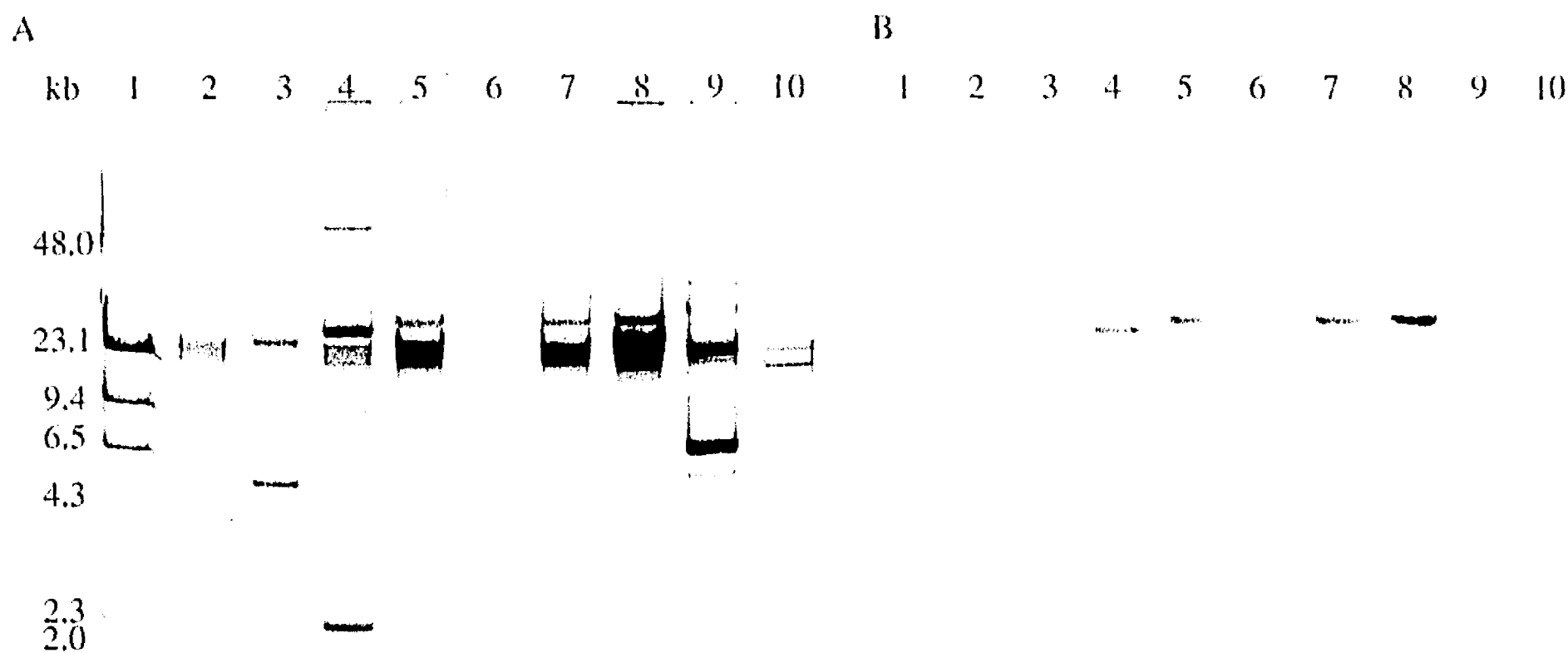


FIG. 3. (A) Agarose gel electrophoresis of plasmids obtained by the alkaline lysis method. (B) Autoradiogram of a Southern blot of the plasmid profile after hybridization with plasmid pAd24 from Brazilian isolate PR 2. Lanes: 1, lambda DNA digested with *Hind*III; lanes 2 through 8, *A. diazotrophicus* PAI 5^T, UAP 7307, UAP 5665, PR 2, PPe4, UAP 5560, and UAP 7210, respectively; lanes 9, *E. coli* G102 harboring pFH101 (7.7 kb); lanes 10, *E. coli* 11B101 and S17 harboring plasmids pRK 2013 (48 kb) and pC131 (17 kb), respectively, used as markers.

DISCUSSION

In this paper we describe an analysis of the ETs, the DNA fingerprint patterns, and the plasmid profiles of different *A. diazotrophicus* strains. The genetic diversity among the *A. diazotrophicus* isolates which we studied was limited. The results of a multilocus enzyme electrophoresis analysis performed to assess variation in 11 metabolic enzyme loci indicated that these isolates are homogeneous in their chromosomal structural genes and revealed levels of genetic diversity that are among the lowest levels that have been reported for bacterial species. The limited genetic variability among isolates

which we observed was consistent with the conserved *nifHDK* gene organization patterns. In addition, Gillis et al. (14) found that the gel electrophoretic cellular protein patterns of seven *A. diazotrophicus* strains are very similar, indicating that these isolates are closely related to one another. Moreover, membrane protein electropherograms revealed similar findings (13a).

Selander et al. (39) have pointed out that "isolates of identical ET are considered members of the same clone, because evolutionary convergence to the same multilocus genotype is highly improbable." Despite the low number of isolates analyzed, the results obtained in this study suggest that *A. diazotrophicus* has a clonal genetic structure on the basis of the wide distribution of one genotype. This type of genetic structure has also been observed for other bacteria (23, 32, 35, 39).

It has been suggested that ecological factors and host specialization contribute to the species diversity of the genus *Legionella* (39). Also, it has been shown that genetic diversity among isolates of *Pseudomonas cepacia* is related to environmental variability in soils (22). Considering these data, we think that the limited genetic diversity of the modern commercial sugarcane varieties (17) and the relatively constant environment inside sugarcane stems, the habitat of *A. diazotrophicus*, may explain the limited genetic diversity of this bacterium.

Dispersal of *A. diazotrophicus* by sugarcane seeds may not occur as we have not been able to isolate the bacteria from seeds. Long-distance dispersal of *A. diazotrophicus* may be explained by considering two characteristics of cultivated sugarcane: (i) sugarcane is normally propagated vegetatively from stem cuttings, where *A. diazotrophicus* occurs endophytically (4, 13); and (ii) frequently, many commercial varieties from one country are cultivated in another country (for instance, cultivars CP 72 2086 and My 55 14 from the United States and Cuba, respectively [Table 2], and other cultivars from different countries, such as Brazil and Australia, are cultivated in Mexico). It seems probable that *A. diazotrophicus* is spread among cane cultivars by the mealybugs associated with sugar-

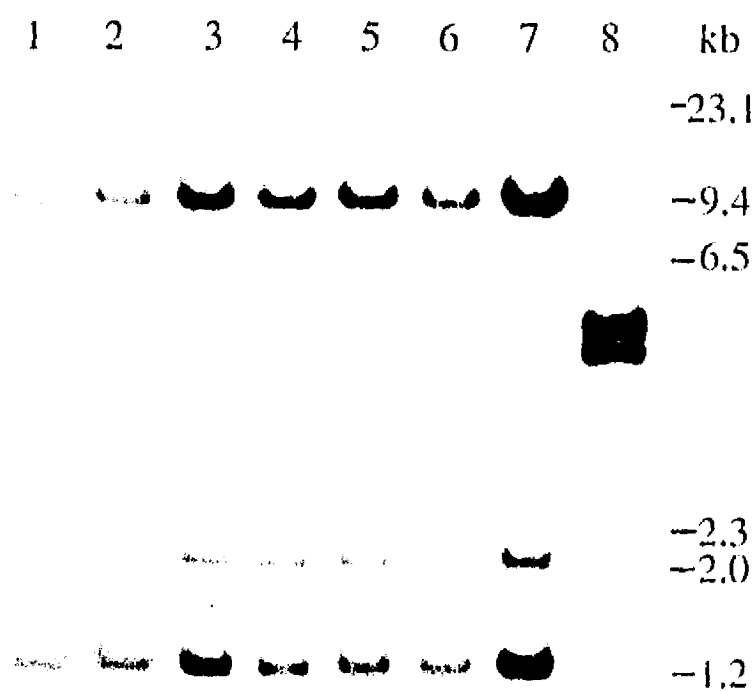


FIG. 4. Autoradiogram of a Southern blot of the total *Eco*RI DNA fingerprints hybridized with the *nifHDK* probe of *R. etli* CFN 42. Lanes 1 through 7, *A. diazotrophicus* UAP 8070, PAI 5^T, PR 2, UAP 5560, PPe4, UAP 5665, and UAP 5541, respectively; lane 8, *R. etli* CFN 42, used as a control.

cane (1), as well as by the spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (26). Therefore, we suppose that the same clone could be recovered from many cane varieties cultivated in many different geographic areas. Genetic diversity studies should be extended to include *A. diazotrophicus* isolates from other sugarcane varieties cultivated in widely separated geographic regions, as well as from other host plants and from different genera of sugarcane-associated mealybugs.

The existence of plasmidless strains (e.g., strain PAI 5⁺) may indicate that fundamental phenotypic characteristics of this species, such as the production of acetic acid, overoxidation of ethanol (the main characteristic that differentiates the genus *Acetobacter*), the use of other carbon substrates, nitrogen fixation, and indoleacetic acid production are not plasmid encoded. In fact, because all of the isolates exhibited activity for all 11 metabolic enzymes tested, we believe that the corresponding structural genes are located on the chromosome. In addition, we have shown that the *nif* genes are chromosomally located. Nevertheless, plasmids may confer some advantage on strains that harbor them, as the majority of isolates contain highly conserved plasmids. Plasmids do play a role in other bacterium-plant or bacterium-insect interactions (3, 6, 7, 19, 24, 30), and we speculate that the *A. diazotrophicus* plasmids could contribute to the fitness of *A. diazotrophicus*-sugarcane or *A. diazotrophicus*-mealybug associations.

To test the hypothesis that the degree of genetic diversity within a bacterial species is related to habitat, it would be interesting to determine if a limited genetic diversity as we have described for *A. diazotrophicus* is a general characteristic of endophytic bacterial populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J. Döbereiner (EMBRAPA, Brazil) for supplying Brazilian isolates of *A. diazotrophicus* and to Silverio Flores Cáceres (CNIAA, Mexico) for supplying sugarcane seeds. We are also grateful to Marco A. Pardo (CFN-UNAM) for valuable opinions on plasmid studies and to Marco A. Rogel for technical assistance in multifocus enzyme electrophoresis assays.

This work was supported in part by grant 400343-5-1848N from CONACYT (Mexico) and by grant UNAM-DGAPA-IN203691.

REFERENCES

- Ashbult, N. J., and P. E. Inkerman. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:707-712.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Bender, C. L., and D. A. Cooksey. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *J. Bacteriol.* **165**:534-541.
- Boddey, R. M., S. Urquiaga, V. Reis, and J. Döbereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* **137**:111-117.
- Cavalcante, V. A., and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23-31.
- Comai, L., G. Surico, and T. Kosuge. 1983. Relation of plasmid DNA to indoleacetic acid production in different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2157-2163.
- Coplin, D. L., R. G. Rowan, D. A. Chisholm, and R. E. Whitmoyer. 1981. Characterization of plasmids in *Erwinia stewartii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:599-604.
- Döbereiner, J., V. M. Reis, M. A. Paula, and F. Olivares. 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, p. 671-676. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Fang, H., R. J. Liu, and R. B. Gennis. 1989. Location of heme axial ligands in the cytochrome *d* terminal oxidase complex of *Escherichia coli* determined by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **264**:8026-8032.
- Fani, R., M. Bazzicalupo, E. Gallori, L. Giovannetti, S. Ventura, and M. Polshelli. 1991. Restriction fragment length polymorphism of *Azospirillum* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**:225-230.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1648-1652.
- Flores, M., V. González, M. A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, D. Romero, D. Piñero, G. Dávila, and R. Palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **170**:1191-1196.
- Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarea-Ocampo, and J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* **154**:145-150.
- Fuentes-Ramírez, L. E., et al. Unpublished data.
- Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, M. Kroppenstedt, M. P. Stephan, K. R. S. Teixeira, J. Döbereiner, and J. De Ley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:361-364.
- Hirsch, P. R., M. Van Montagu, A. W. B. Johnston, N. J. Brewin, and J. Schell. 1980. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:403-412.
- Lá, R. P., and I. C. Macrae. 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* **23**:999-1002.
- Liu, M. C. 1984. Sugarcane, p. 572-605. In W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (ed.), *Handbook of plant cell culture*. Macmillan Publishing Co., New York.
- Magariños, B., J. L. Romalde, I. Bandín, B. Fouz, and A. E. Toranzo. 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3316-3322.
- Martínez, E., D. Romero, and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**:59-93.
- Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417-426.
- Mavingui, P., G. Laguerre, O. Berge, and T. Heulin. 1992. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1894-1903.
- McArthur, J. V., D. A. Kovacic, and M. H. Smith. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9621-9624.
- Musser, J. M., D. M. Granoff, P. E. Pattison, and R. K. Selander. 1985. A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5078-5082.
- Nester, E. W., and T. Kosuge. 1981. Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**:531-565.
- Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* **154**:148-155.
- Paula, M. A., S. Urquiaga, J. O. Siqueira, and J. Döbereiner. 1992. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol. Fertil. Soils* **14**:61-66.
- Piñero, D., E. Martínez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2825-2832.
- Plazinski, J., P. J. Dart, and B. G. Rolfe. 1983. Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. *J. Bacteriol.* **155**:1429-1433.
- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, M. L. Girard, E. Calva, and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1170-1174.

30. Rosenberg, C., P. Boistard, J. Denarie, and F. Casse-Delbart. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**:326-333.
31. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
32. Schill, W. B., S. R. Phelps, and S. W. Pyle. 1984. Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:975-979.
33. Schmidt, E. L., M. J. Zidwick, and H. M. Abebe. 1986. *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 and diversity among member isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1212-1215.
34. Segovia, L., J. P. W. Young, and E. Martínez-Romera. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium cili* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:374-377.
35. Selander, R. K., P. Beltran, N. H. Smith, R. M. Barker, P. B. Crichton, D. C. Old, J. M. Musser, and T. S. Whittam. 1990. Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of *Salmonella paratyphi* B. *Infect. Immun.* **58**:1891-1901.
36. Selander, R. K., P. Beltran, N. H. Smith, R. Helmuth, F. A. Rubin, D. J. Kopecko, K. Ferris, B. D. Tall, A. Cravioto, and J. M. Musser. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* **58**:2262-2275.
37. Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:873-884.
38. Selander, R. K., and B. R. Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli*. *Science* **210**:545-547.
39. Selander, R. K., R. M. McKinney, T. S. Whittam, W. F. Bibb, D. J. Brenner, F. S. Nolte, and P. E. Pattison. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **163**:1021-1037.
40. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
41. Woamer, P., P. W. Singleton, and B. B. Bohlool. 1988. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1112-1116.

SEGUNDA FASE

ANTECEDENTES

Como puede apreciarse en el trabajo anterior, las cepas de *A. diazotrophicus* fueron analizadas en su perfil plasmídico, homología estructural de los plásmidos y en su patrón de restricción del DNA, así como en su patrón de RFLPs correspondientes a los genes *nifHDK* y patrón electroforético de enzimas (electroferotipos = ETs).

Mediante los diferentes métodos de análisis empleados, consistentemente observamos una diversidad genética limitada dentro de la población de *A. diazotrophicus* estudiada.

Estos resultados contrastan fuertemente con los obtenidos en muchos estudios de muy diferentes poblaciones bacterianas, en los cuales se observó gran variabilidad (ver referencias de la Tabla 1 presentada en la introducción).

Tomando en cuenta los resultados previos, se plantearon las siguientes hipótesis.

HIPOTESIS

1. Dado que tanto la especialización de hospedero como la variabilidad ambiental pueden contribuir en la diversidad genética bacteriana, consideramos posible que organismos hospederos diferentes a la caña de azúcar pudieran mantener clonas de *A. diazotrophicus* diferentes a las recobradas de esa planta.
2. Tomando en consideración que *A. diazotrophicus* se ha propuesto como microbiota autóctona de homópteros asociados a la caña de azúcar y no como microbiota indígena de esa planta, existe la posibilidad de que solamente algunas clonas de la población total de *A. diazotrophicus*, que albergan los insectos, puedan haberse adaptado al microambiente de la caña y por ello la diversidad genética limitada que se observó en cepas aisladas de esa planta.
3. Considerando el intenso intercambio de germoplasma de caña de azúcar existente entre países, así como la propagación vegetativa de éste cultivo y la asociación común del homóptero *S. sacchari* con la caña, se propone que exista una muy amplia dispersión de una clona y consecuentemente ésta pudiera ser aislada de la mayoría de las variedades comerciales de caña de azúcar cultivada en muy diferentes regiones geográficas del mundo.

OBJETIVO

Ampliar el conocimiento sobre la dispersión, diversidad y estructura genética de *A. diazotrophicus*, mediante el análisis de cepas aisladas del insecto *S. sacchari* y de diferentes plantas hospederas, cultivadas en regiones geográficas ampliamente distantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Son reseñados y analizados en el trabajo:

Genetic Structure of *Acetobacter diazotrophicus* Populations and Identification of a New Genetically Distant Group. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3008-3013. 1995. Este se presenta a continuación.

Genetic Structure of *Acetobacter diazotrophicus* Populations and Identification of a New Genetically Distant Group

JESUS CABALLERO-MELLADO,^{1*} LUIS E. FUENTES-RAMIREZ,¹ VERONICA M. REIS,² AND ESPERANZA MARTINEZ-ROMERO¹

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico,¹ and EMBRAPA, Km 47, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica 23851-970, Rio de Janeiro, Brazil²

Received 30 January 1995/Accepted 19 May 1995

A total of 55 isolates of *Acetobacter diazotrophicus* recovered from diverse sucrose-rich host plants and from mealybugs associated with sugarcane plants were characterized by the electrophoretic mobilities of 12 metabolic enzymes. We identified seven different electrophoretic types (ETs), six of which are closely related within a genetic distance of 0.195 and exhibit high DNA-DNA homology. The seventh ET was largely divergent, separated at a genetic distance of 0.53, and had only 54% DNA homology to the reference strain. Strains corresponding to ET 7 could represent a distinct nitrogen-fixing species of the genus *Acetobacter*. More genetic diversity was found in isolates from Brazil than in those from Mexico, probably due to the very different crop nitrogen fertilization levels used.

Cane sugar is produced commercially in over 70 countries around the world (31). It is an important agricultural product which is used for domestic consumption and export. More than 150 by-products may be obtained from sugarcane (33). For instance, ethanol obtained by fermentation and distillation of sugarcane juice provides fuel for 4 million motor vehicles in Brazil, and 7 million other vehicles use gasohol containing 10 to 22% ethanol (5).

Commonly, very high levels of nitrogen fertilizers (120 to 300 kg of N per ha) are used in sugarcane crops in countries such as Mexico, Venezuela, Cuba, and the United States (Hawaii). In contrast, sugarcane crops in Brazil do not receive more than 50 kg of nitrogen fertilizer (37), and neither cane yields nor soil N reserves appear to diminish after decades of culture (5). Recent experiments estimated that the contribution of biological nitrogen fixation to the sugarcane cultivars ranged from 50 to 80% of total plant nitrogen (5, 52).

Nitrogen-fixing bacterial species, such as *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, and *Azospirillum* spp., are commonly isolated from different internal or external parts of sugarcane plants (37; unpublished results). Recently, other diazotrophs (*Herbaspirillum seropedicae* [3] and *Acetobacter diazotrophicus* [11, 17]) have been isolated from inside tissues of roots and stems of sugarcane. At present, which of these bacteria are the most important in plant-associated biological nitrogen fixation remains unknown. However, *A. diazotrophicus* has been suggested as a strong candidate responsible for the N₂ fixation observed in field experiments with sugarcane (5, 51).

A. diazotrophicus has also been recovered from other sucrose-rich host plants such as sweet potato (*Ipomoea batatas*) and Cameroon grass (*Pennisetum purpureum*), which are vegetatively propagated (15), as well as from different genera of mealybugs associated with sugarcane plants (1).

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) has been used extensively to measure genotypic diversity and genetic structure of natural populations of many bacterial species (43). Such studies have revealed that the levels of genetic variability

differ greatly among species. For instance, *Yersinia ruckeri* organisms exhibit a genetic diversity as low as 0.014 (38), while oral streptococci show a diversity as high as 0.857 (19). Between these extremes are found very different pathogenic bacterial species of plants (14), animals (4, 30), and humans (10, 13, 29, 42), as well as soil bacterial species, including *Bacillus* spp. (9, 21), a *Bradyrhizobium* sp. (6), *Pseudomonas cepacia* (27), and *Rhizobium* spp. (16, 24, 35). Genetic diversity levels have mainly been related to effective population size (28, 45) and recent evolutionary origin of the species (12, 28), along with ecological factors (27, 45) and niche specialization (14, 23, 30, 40).

Taking into account that "the characterization and understanding of natural populations of useful bacteria may save work and money in the development of low-risk, successful biotechnology" (46), we considered it of interest to extend our previous studies on genetic diversity of *A. diazotrophicus* isolated from sugarcane (8) to include bacteria isolated from other host plants such as sweet potato and *P. purpureum* and from the mealybug *Saccharicoccus sacchari*. In this work, we report the genetic relatedness among isolates recovered mainly from Mexico and Brazil. We show evidence of a new genetically distinct group.

MATERIALS AND METHODS

Isolation. *A. diazotrophicus* strains were isolated from the inside tissues of stems or roots of sugarcane plants cultivated in Mexico, as described previously (17).

Each mealybug colony, identified as *S. sacchari*, sampled from stems of independent sugarcane plants was rinsed with 0.01% (vol/vol) Tween 40 in 10 mM MgSO₄ · 7H₂O until the liquid was clear. Subsequently, mealybugs were immersed in 1% chloramine T for 5 min and then washed three times in 10 mM MgSO₄ · 7H₂O. Insects were macerated in 1.0 ml of sterile distilled water, and aliquots were inoculated into media for isolation of *A. diazotrophicus*, as described previously (17).

Mealybug colonies and sugarcane varieties sampled in Mexico were from diverse cane-growing areas up to 1,500 km apart; cane-growing areas of Brazil were located up to 2,500 km apart.

Bacterial strains. Strains and their sources are shown in Table 1. Most of the strains were recovered from hosts collected in Mexico and Brazil, but the samples also included two isolates from Australia and one from Uruguay. Strain 7.10RM was recovered from within spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* obtained from sweet potatoes grown in soil inoculated with a mixture of the fungus and strain PA1 5^T of *A. diazotrophicus*. Only isolates

* Corresponding author.

TABLE 1. ETs, host species, and locality for 55 isolates of *A. diazotrophicus*

ET	Strain	Host species	Locality	Source
1	CFNE 501	Stem, Z Mex 55 32 ^a	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 502	Stem, Mex 69 290 ^a	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 503	Stem, RD 75 01 ^b	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 504	Stem, Mex 73 523 ^a	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 505	Stem, Mex 68 P23 ^a	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 506	Stem, RD 75 11 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 507	Stem, RB 73 9953 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 508	Stem, SP 70 1005 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 509	Stem, SP 70 3370 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 510	Stem, RB 72 1012 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 513	Stem, My 55 14 ^b	Puebla, Mexico	This work
1	CFNE 515	Stem, SP 70 1248 ^b	Puebla, Mexico	This work
1	CFNE 516	Roots, SP 70 1248 ^b	Puebla, Mexico	This work
1	CFNE 521	Roots, CP 72 2086 ^b	Veracruz, Mexico	This work
5	PAI 3	Roots, sugarcane	Alagoas, Brazil	CNPAB collection ^c
1	PRJ 6	Roots, CB 47 89	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
7	PRJ 14	Stem, SP 70 1143	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PRJ 17	Stem, IAC 52 150	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
3	PRJ 20	Stem, Na 56 79	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PRJ 24	Roots, RB 73 9735	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
7	PRJ 36	Stem, SP 70 1143	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
7	PRJ 40	Leaves (trash), CB 36 14	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PRJ 54	Stem, Krakatau	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PRJ 56	Stem, SP 70 1143	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
3	PRX 3	Xylem, CB 45 3	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
3	PRX 6	Xylem, Na 56 79	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
3	PSP 15	Roots, Na 56 79	São Paulo, Brazil	CNPAB collection
4	PSP 22	Leaf, Na 56 79	São Paulo, Brazil	CNPAB collection
3	PSP 32	Stem, Na 56 79	São Paulo, Brazil	CNPAB collection
6	PSP 17	Rhizoplane, Na 56 79	São Paulo, Brazil	CNPAB collection
3	PSP 19	Rhizoplane, Na 56 79	São Paulo, Brazil	CNPAB collection
1	URU	Roots, sugarcane	Uruguay	CNPAB collection
7	LMG 1733	Sugarcane	Australia	CNPAB collection
1	CFNE 530	Mealybugs-PT 49 143 ^b	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 531	Mealybugs-PT 49 143 ^b	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 532	Mealybugs-Z Mex 55 32 ^a	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 533	Mealybugs-L 78 56 ^b	Veracruz, Mexico	This work
1	CFNE 534	Mealybugs-Mex 68 P23 ^a	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 535	Mealybugs-RD 75 11 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 537	Mealybugs-RB 73 9953 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 539	Mealybugs-RB 72 1012 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 541	Mealybugs-RB 72 1012 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 542	Mealybugs-RB 72 1022 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
1	CFNE 544	Mealybugs-RB 73 9953 ^b	Sinaloa, Mexico	This work
2	CFNE 550	Mealybugs-CB 45 3 ^d	Rio de Janeiro, Brazil	This work
2	CFNE 554	Mealybugs-CB 45 3 ^d	Rio de Janeiro, Brazil	This work
6	1772	Mealybugs	Ayr, Australia	M. W. Dawson ^e
1	PBD 4	Tuber, sweet potato	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PBD 13	Peel, sweet potato	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PBD 16	Roots, sweet potato	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
1	PBD 17	Tuber, sweet potato	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
3	Pcol	Stem, <i>P. purpureum</i>	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
7	PRC 1	Stem, <i>P. purpureum</i>	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
7	PRC 4	Roots, <i>P. purpureum</i>	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection
3	7.10RM	Spores, VAM fungus ^f	Rio de Janeiro, Brazil	CNPAB collection

^a Commercial sugarcane varieties.

^b Sugarcane germoplasm.

^c CNPAB, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Rio de Janeiro, Brazil.

^d Collected from sugarcane grown in a concrete tank (5).

^e M. W. Dawson, Sugar Research Institute, Mackay, Queensland, Australia.

^f VAM, vesicular-arbuscular mycorrhizal.

recovered from different plants or mealybug colonies were considered to be different. Strain 1772 was kindly supplied by M. Dawson. Strains UAP 5560, PAI 5^T (= ATCC 49037^T [T = type strain]), and PPe 4 (= ATCC 49038) of *A. diazotrophicus*, corresponding to electrophoretic type (ET) 1, ET 3, and ET 4 as we described previously (8), were included as references in MLEE assays.

Culture media. *A. diazotrophicus* isolates and *Escherichia coli* HB 101 were grown in SYP medium (8) for all assays.

Preparation of cell extracts and MLEE. Each isolate was grown in 25 ml of SYP medium at 29°C and harvested by centrifugation, and pellets were suspended in 0.3 ml of 10 mM MgSO₄ · 7H₂O and treated as described previously (8).

Starch gel electrophoresis and the selective staining of 12 metabolic enzymes were done by methods described before (43). The enzymes assayed were the same ones used in a previous report (8), except for an unidentified dehydroge-

TABLE 2. Genetic diversity among isolates and ETs at 12 enzyme loci

Enzyme locus ^a	No. of alleles	Genetic diversity (<i>H</i>) ^b of:		No. of alleles	Genetic diversity (<i>H</i>) ^b of:	
		55 isolates	7 ETs		49 isolates ^c	6 ETs ^d
IPO	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000
LYD	2	0.197	0.285	1	0.000	0.000
LED	2	0.197	0.285	1	0.000	0.000
XDH	2	0.197	0.285	1	0.000	0.000
MDH	2	0.197	0.285	1	0.000	0.000
ADH	2	0.197	0.285	1	0.000	0.000
UDH	2	0.197	0.285	1	0.000	0.000
IDH	2	0.036	0.285	2	0.041	0.332
G6P	2	0.235	0.285	2	0.279	0.332
PGM	4	0.173	0.713	4	0.194	0.799
HEX	2	0.036	0.285	2	0.041	0.332
EST	3	0.103	0.523	3	0.119	0.600
Mean	2.16	0.147	0.316	1.66	0.056	0.199

^a IPO, indophenol oxidase; LYD, lysine dehydrogenase; LED, leucine dehydrogenase; XDH, xanthine dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; UDH, unidentified dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; G6P, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGM, phosphoglucomutase; HEX, hexokinase; EST, esterases.

^b $H = (1 - \sum x_i^2) / (n(n-1))$, where x_i is the frequency of the i th allele and n is the number of isolates or ETs.

^c Excluding six isolates represented by ET 7.

^d Excluding ET 7.

nase. This enzyme was visualized on gels stained for indophenol oxidase, which is revealed as white bands in the presence of light. In contrast, the unidentified dehydrogenase was observed as a typical purple band, like other dehydrogenases. We did not attempt to determine the substrate(s) for this enzyme. For all assays the electrophoretic buffer system used was Tris-citrate (pH 8.0). Distinctive combinations of alleles for the 12 enzyme loci (multilocus genotypes) were designated different ETs (43). The level of genetic diversity for each enzyme locus was calculated as described by Selander et al. (43).

Statistical analysis. The extent of linkage disequilibrium, or nonrandom association of alleles, in the studied population was evaluated to explore the degree of clonality. The ratio of the variance in mismatches observed (V_o) to the expected variance (V_e) in the population was iterated 10,000 times by a Monte Carlo procedure, as proposed by Souza et al. (47).

Total DNA isolation, DNA restriction, and filter blot hybridization. Total DNA was isolated as described previously (2). DNA was digested with *Eco*RI, and restriction fragments were electrophoresed, blotted, and hybridized as previously reported (8). DNA-DNA homology was based on relative levels of hybridization to ³²P-labelled DNA from *A. diazotrophicus* PAI 5^T. DNA amounts in gels and radioactivity levels were quantified as described before (26).

The restriction fragment length polymorphism patterns of the rRNA operons were determined from *Eco*RI DNA digests hybridized with a *Hind*III-*Hind*III 700-bp internal fragment from *E. coli* *mB* 16S rRNA genes cloned in pKK3535 (7).

RESULTS

MLEE and genetic diversity. A total of 55 isolates of *A. diazotrophicus* were examined, and 11 of the 12 enzyme loci analyzed were found to be polymorphic. The mean number of alleles was 2.16 (range, 1 to 4) (Table 2). A total of seven distinctive ETs were identified (Table 3). Most of the isolates (35 of 55; 64%) were identical, corresponding to ET 1. ET 4 and ET 5 were represented by only one isolate; ET 2 and ET 6 were each represented by two isolates only. Only strains corresponding to ET 1 were recovered from mealybug colonies associated with seven different sugarcane varieties and from 13 sugarcane varieties sampled in Mexico (including 5 Brazilian varieties); in contrast, seven ETs were identified from 7 sugarcane varieties cultivated in Brazil and from associated mealybugs (Table 1). Six of the ETs differed from one another at only one or two loci. However, strains grouped in ET 7 were very different from all other isolates, showing six unique alleles (Table 3). These strains were recovered from both *P. purpureum* and sugarcane sampled in Brazil, and one strain (LMG 1733) was isolated from sugarcane in Australia.

The mean level of genetic diversity per locus (*H*) among the seven ETs was found to be 0.316. However, the genetic diversity among isolates was lower (*H* = 0.147) (Table 2), reflecting the fact that four of the ETs were represented by one or two isolates, while only three ETs (ET 1, ET 3, and ET 7) represented 49 isolates (Table 3). Excluding ET 7, because it is largely divergent from all of the other ETs (see below), the *H* level among the six ETs was 0.199, and among isolates it was as low as 0.056 (Table 2), since in this case only two ETs (ET 1 and ET 3) represented 88% of the isolates.

The genetic relationships among the seven ETs are summarized by a dendrogram in Fig. 1. Six ETs (ET 1 to ET 6) were closely related, forming a cluster at a genetic distance of 0.195. A second line (ET 7), which contained six strains, was largely divergent, and it was separated by a genetic distance of 0.53.

DNA homology and ribosomal hybridization restriction fragment length polymorphisms. Six *A. diazotrophicus* strains from the closely related ETs 1 to 6 constituted a homogeneous group with relative levels of DNA homology ranging from 73 to 90% (mean homology, 86%) with reference strain PAI 5^T. This mean homology value was very similar to the level of 84% DNA homology previously determined by Gillis et al. (18) among three representative *A. diazotrophicus* strains, including the type strain PAI 5^T. The six strains corresponding to the more distant ET 7 (Table 1) exhibited only 54% homology to the same reference strain.

Strains CFNE 501, PAI 5^T, PSP 22, PAI 3, PRC 1, and LMG 1733 were analyzed by restriction fragment length polymor-

TABLE 3. Allele profiles at 12 enzyme loci in seven ETs of *A. diazotrophicus*

ET	Reference strain	No. of isolates	Allele at indicated enzyme locus ^a											
			IPO	LYD	LED	XDH	MDH	ADH	UDH	IDH	G6P	PGM	HEX	EST
1	CFNE 501	35	1	2	3	2	2	2	2	1	4	5	1	3
2	CFNE 550	2	1	2	3	2	2	2	2	1	4	6	1	3
3	PAI 5 ^T	8	1	2	3	2	2	2	2	1	5	5	1	3
4	PSP 22	1	1	2	3	2	2	2	2	2	4	5	2	3
5	PAI 3	1	1	2	3	2	2	2	2	1	4	7	1	1
6	1772	2	1	2	3	2	2	2	2	1	4	4	1	4
7	PRC 1	6	1	1	2	1	1	1	1	1	4	5	1	3

^a IPO, indophenol oxidase; LYD, lysine dehydrogenase; LED, leucine dehydrogenase; XDH, xanthine dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; UDH, unidentified dehydrogenase; IDH, isocitrate dehydrogenase; G6P, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGM, phosphoglucomutase; HEX, hexokinase; EST, esterases.

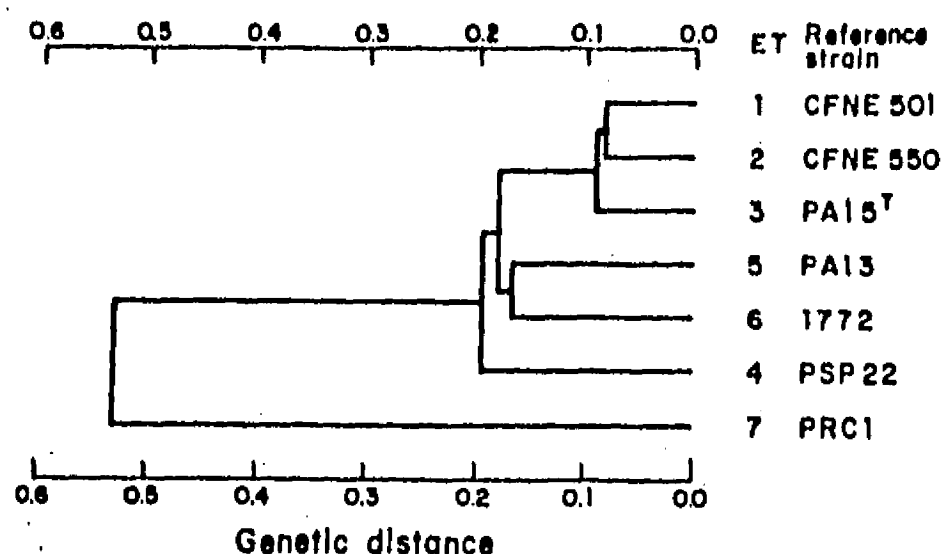


FIG. 1. Genetic relationships of ETs identified among *A. diazotrophicus* isolates recovered from different hosts.

phisms of the rRNA operons. The hybridizing patterns were identical. Four common hybridizing bands (9.3, 3.6, 2.3, and 1.6 kb) were observed in all of the isolates examined (Fig. 2). Similarly, all strains showed a common pattern (8) of hybridization to *nifHDK* (data not shown).

Linkage disequilibrium. A total of 1,485 pairwise comparisons are possible among the 55 isolates. The observed variance in proportion of mismatches was 5.806, and the expected variance was 1.450. The ratio of the observed variance in numbers of mismatches to the expected variance (V_o/V_e) was 4.003, highly significant, indicating a strong linkage disequilibrium. The analyses done separately for the populations recovered from sugarcane cultivated in Brazil and Mexico revealed a strong linkage disequilibrium also (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we report that there is a lower genetic diversity in *A. diazotrophicus* recovered from different host species collected in widely separated regions of the world in comparison to the majority of other bacterial species studied (6, 9, 10, 13, 14, 19, 29, 35, 44). The results confirm previous data (8) on genetic diversity among 21 Mexican and 3 Brazilian isolates exclusively recovered from sugarcane plants. In addition, a new genetically distant group was found.

Coefficients of genetic distance at levels higher than 0.5 have been used as a criterion to suggest species limits (27, 45). DNA-DNA hybridization levels below 60 to 70% are also in-

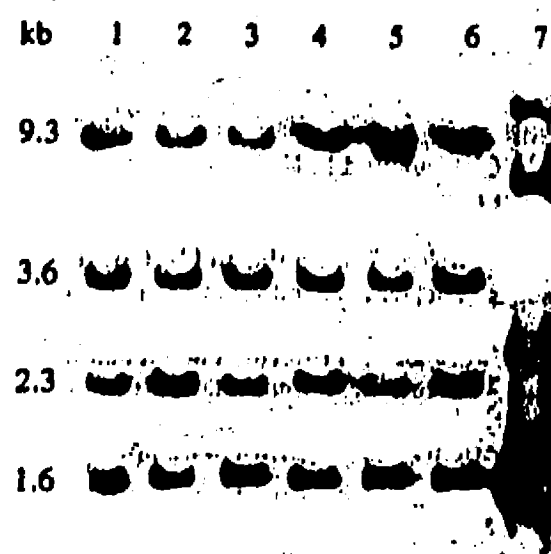


FIG. 2. Autoradiogram of a Southern blot of the total *EcoRI* DNA fingerprints hybridized with a 16S rDNA probe of *E. coli*. Lanes 1 through 6, strains CFNE 501 (ET 1), PA15^T (ET 3), PSP 22 (ET 4), PA13 (ET 5), PRC1, and LMG 1733 (ET 7), respectively; lane 7, *E. coli* HB 101, used as a control.

dicative of separate species (39, 48). On the basis of these facts, our MLEE studies suggest that the strains represented by ET 7 could represent a distinct nitrogen-fixing bacterial species. This result was consistent with the level of DNA-DNA homology obtained. In other cases, the estimates of genetic relatedness of strains obtained by both DNA-DNA hybridization and MLEE are closely correlated (24, 32, 41, 45). Nevertheless, restriction fragment length polymorphism patterns of ribosomal genes showed that ET 7 is related to the main *A. diazotrophicus* cluster. Due to the conserved nature of the 16S rDNA sequences, the method may be limited in the differentiation of closely related species (22). Furthermore, "DNA hybridization is acknowledged as the superior method for the elucidation of relationships between closely related taxa, such as strains and species" (48). Further work will be required to define the taxonomic status of ET 7 strains.

The restricted genetic variability observed in *A. diazotrophicus* suggests that this species has a recent evolutionary origin. Another possible explanation for the limited genetic diversity is related to the predominantly endophytic habitat of *A. diazotrophicus*, as suggested before (8), in association with niche specialization, because this species has been isolated exclusively from sucrose-rich host plants (15, 25) and from mealybugs associated with sugarcane plants (1). It has been postulated that each ecological niche acts as a selective force toward those properties of the organism that enable it to occupy that niche. Thus, the nonrandom variation suggests that the organisms are selected from those occupying closely related niches rather than very different niches (20). We do not discount that the limited genetic diversity observed in *A. diazotrophicus* could be related to the analysis of a limited subset of clones of the species, as advanced to explain the genetic diversity in other bacterial species (28, 45). This hypothesis is based on the very high selectivity of the medium used for bacterial isolation (15, 17, 36), which could influence the selection of subsets of all genotypes existing in nature. It has been observed that isolated soil bacteria make up only a very small proportion of the total bacterial community, but the largest proportion cannot be isolated or cultured on laboratory media (50).

Overrepresentation of a particular multilocus genotype is often the strongest and most significant evidence of clonality (49), particularly when the same genotype is recovered at many different localities and at different times (30, 45). The frequent recovery of isolates corresponding to the same ET from widely separated geographic regions, as well as from different hosts at different times, indicated that the genetic structure of *A. diazotrophicus* is basically clonal. This result was supported by the occurrence of a strong linkage disequilibrium in the natural population of these bacteria at both global and local levels.

The extensive distribution of closely related strains of *A. diazotrophicus* from widely separated areas of the world suggests that this bacteria was recently dispersed, as has been observed similarly in *Pseudomonas syringae* pv. tomato (14). Taking into account the endophytic characteristics of *A. diazotrophicus* and the association of the bacteria with mealybugs and vesicular-arbuscular mycorrhizal spores, we previously (8) explained the long-distance dispersal and spread among cane cultivars of this species.

It was previously suggested (1) that *A. diazotrophicus* may be autochthonous microbiota of mealybugs associated with sugarcane and other plants. However, we were able to isolate the bacteria from only 30 of 80 mealybug colonies of *S. sacchari*, including actively feeding adults, collected from stems of many different sugarcane varieties cultivated in both Brazil and Mexico. This fact suggests that *A. diazotrophicus* is sucked from sugarcane plants by the associated mealybugs, which is further

supported by our results showing that the *A. diazotrophicus* population recovered from *S. sacchari* is a subset of the *A. diazotrophicus* sugarcane population. The genetic diversity of *A. diazotrophicus* from other genera of mealybugs such as *Dysmicoccus brevipes* and a *Planococcus* sp. has not been analyzed, but perhaps it would be not surprising to find a limited genetic variability in these populations as well.

The comparison of the number of ETs identified in the collections of isolates recovered from sugarcane and mealybugs sampled in Brazil and Mexico showed that the population of *A. diazotrophicus* collected in Brazil, represented by seven ETs, is more heterogeneous genetically than the population collected in Mexico, represented only by ET 1. This apparent greater genetic heterogeneity may be related to the very different nitrogen fertilization levels that are applied to sugarcane field crops in Mexico in comparison to Brazil. A close relationship between nitrogen fertilization rates and isolation frequency of *A. diazotrophicus* was previously observed (17). At the highest fertilization rates (300 kg of N per ha), isolation frequencies of 0 to 2% were obtained, while at levels of 120 kg of N per ha frequencies increased up to 70%. Moreover, although Li and Macrae (25) did not mention any relation between isolation frequency of *A. diazotrophicus* and nitrogen fertilization, we noted that, in their results reported in Table 1, the number of isolates of this bacterium was nearly five times higher in the same sugarcane variety (CP 44101) with no N fertilizer than in N-fertilized plants collected in the same region and on the same date. Taking these observations into account, nitrogen seems to be a selective factor for certain lineages or clones of *A. diazotrophicus*. A role for a selective factor(s) may be supported in view of the endophytic nature of *A. diazotrophicus* organisms (25, 36), which supposedly are dispersed long distance inside sugarcane germoplasm commonly exchanged between countries (e.g., germoplasm of Brazilian varieties cultivated in Mexico [Table 1]). Therefore, in the absence of such a selective factor, different clones recovered in a country could be recovered from sugarcane germoplasm propagated in widely separated geographical areas. The nitrate levels available to the plant may increase or diminish the sucrose content depending on the sugarcane cultivar (34). This may explain to some extent the nitrogen fertilization effects on *A. diazotrophicus* populations, considering that sucrose is the best carbon source required in high concentration for optimal bacterial growth (11, 18). However, we could not exclude that other ecological factors, besides nitrogen fertilization rates, may contribute to the differences in genetic diversity of the *A. diazotrophicus* populations encountered in Brazil and Mexico.

Since a low number of isolates recovered from Cameroon grass and sweet potato were analyzed, it was not possible to determine if certain ETs of *A. diazotrophicus* are predominantly associated with a particular host species, as observed, for instance, with the pathogen of mammals *Bordetella bronchiseptica* (28) or with the legume-nodulating *Bradyrhizobium* sp. (6). However, the results clearly demonstrated that ET 1 was extensively distributed among all host species analyzed. From the viewpoint of biotechnological application, it will be important to determine if strains represented by the highly predominant ET 1 could be more efficient in promoting growth of the host plants by either involving indoleacetic acid (17) or supplying nitrogen (5, 51), or both, in comparison to other lineages, or if ET 1 is simply a highly "successful" lineage adapted to different host species.

Considering the apparent wide capacity of ET 1 to colonize sucrose-rich host plants, it will be interesting to determine this

ability of ET 1 strains in other important sugar producer plants such as sugar beet (*Beta vulgaris*).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J. Döbereiner (EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brazil) for valuable opinions, David Romero (Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno-Universidad Nacional Autónoma de México) for transmittance scanning densitometry analysis, Valeria Souza (Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México) for her help in the statistical analysis to define the clonality of the population, and Marco A. Rogel for technical assistance in MLEE assays. We are also grateful to M. A. Gómez Flores (Colegio de Postgraduados, Córdoba, Mexico), Gustavo Mata (Grupo Xafratec, Ingenio Casasano), and José Sánchez for their support in collecting sugarcane plants and the associated mealybugs.

This work was supported by grant 4003-13-5-1E48N from CONACYT-MEXICO.

REFERENCES

1. Ashbolt, N. J., and P. E. Inkerman. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:707-712.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
3. Baldaul, V. L. D., J. I. Baldaul, F. Olivares, and J. Döbereiner. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 13:65-73.
4. Beltran, P., J. M. Musser, R. Helmuth, J. J. Farmer III, W. M. Frerichs, I. K. Wachsmuth, K. Ferris, A. C. McWhorter, J. G. Wells, A. Cravlotto, and R. K. Selander. 1988. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationship among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7753-7757.
5. Boddey, R. M., S. Urquiza, V. M. Rels, and J. Döbereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* 137:111-117.
6. Bottomley, P. J., H.-H. Cheng, and S. R. Strain. 1994. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1754-1761.
7. Broslus, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148:107-127.
8. Caballero-Mellado, J., and E. Murfinez-Romero. 1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1532-1537.
9. Carlson, C. R., D. A. Caugant, and A. B. Kolsto. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1719-1725.
10. Caugant, D. A., L. O. Froholm, K. Bover, E. Holten, C. E. Frasch, L. F. Morca, W. D. Zollinger, and R. K. Selander. 1986. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4927-4931.
11. Cavalcante, V. A., and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31.
12. Clark-Curtiss, J. E., and G. P. Walsh. 1989. Conservation of genomic sequences among isolates of *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* 171:4844-4851.
13. Combe, M. L., J. L. Pons, R. Sesboue, and J. P. Martin. 1994. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets, a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:26-30.
14. Denny, T. P., M. N. Gilmour, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1949-1960.
15. Döbereiner, J., V. M. Rels, M. A. Puulu, and F. Olivares. 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, p. 671-676. In R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
16. Eardly, B. B., L. A. Materon, M. H. Smith, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:187-194.
17. Fuentes-Ramirez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Aburca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154:145-150.
18. Gillis, M., K. B. Hoste, D. Janssens, R. M. Kroppenstedt, M. P. Stephan, K. R. S. Teixeria, J. Döbereiner, and J. De Ley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sug-

- arcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:361-364.
19. Gilmour, M. N., T. S. Whittam, M. Killan, and R. K. Selander. 1987. Genetic relationships among the oral streptococci. *J. Bacteriol.* 169:5247-5257.
 20. Hildebrand, D. C., M. N. Schroth, and O. C. Hulsman. 1982. The DNA homology matrix and non-random variation concepts as the basis for the taxonomic treatment of plant pathogenic and other bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20:235-256.
 21. Istock, C. A., K. E. Duncan, N. Ferguson, and X. Zhou. 1992. Sexuality in a natural population of bacteria—*Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol. Ecol.* 1:95-103.
 22. Laguerre, G., M.-R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
 23. Lazo, G. R., R. Roffey, and D. W. Gabriel. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:214-221.
 24. Leung, K., S. R. Strain, F. J. De Bruijn, and P. J. Bottomley. 1994. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:416-426.
 25. Li, R. P., and I. C. Macrae. 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 23:999-1002.
 26. Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
 27. McArthur, J. V., D. A. Kovacic, and M. H. Smith. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9621-9624.
 28. Musser, J. M., D. A. Bemis, H. Ishikawa, and R. K. Selander. 1987. Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 169:2793-2803.
 29. Musser, J. M., D. M. Granoff, P. E. Pattison, and R. K. Selander. 1985. A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5078-5082.
 30. Musser, J. M., E. L. Hewlett, M. S. Peppler, and R. K. Selander. 1986. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J. Bacteriol.* 166:230-237.
 31. Nickell, L. G. 1983. Sugarcane, p. 185-205. *In* L. G. Nickell (ed.), *Plant growth regulating chemicals*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 32. Ochman, H., T. S. Whittam, D. A. Caugant, and R. K. Selander. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* 129:2715-2726.
 33. Paturau, J. M. 1988. Alternative uses of sugarcane and its byproducts in agroindustries, p. 24-44. *In* R. Sansourcy, G. Aarts, and T. R. Preston (ed.), *Sugarcane as feed*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
 34. Pelaez Abellan, I., R. De Armas Urgulza, M.-H. Valadler, and M.-L. Champigny. 1994. Short-term effect of nitrate on carbon metabolism of two sugar cane cultivars differing in their biomass production. *Phytochemistry* 36:819-823.
 35. Piñero, D., E. Martínez, and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
 36. Reis, V. M., F. Olivares, and J. Döberlner. 1994. Improved methodology for isolation of *A. diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Appl. Microbiol.* 10:401-405.
 37. Ruschel, A. P., and P. B. Vose. 1984. Biological nitrogen fixation in sugar cane, p. 219-235. *In* N. S. Subba Rao (ed.), *Current development in biological nitrogen fixation*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
 38. Schill, W. B., S. R. Phelps, and S. W. Pyle. 1984. Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:975-979.
 39. Schleifer, K. H., and E. Stackebrandt. 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:143-187.
 40. Scholz, B. K., J. L. Jakobek, and P. B. Lindgren. 1994. Restriction fragment length polymorphism evidence for genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1093-1100.
 41. Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios, and E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:426-433.
 42. Selander, R. K., P. Beltran, N. H. Smith, R. Helmuth, F. A. Rubin, D. J. Kopecko, K. Ferris, H. D. Tall, A. Cravotto, and J. M. Musser. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* 58:2262-2275.
 43. Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:873-884.
 44. Selander, R. K., T. K. Korhonen, V. Vaisanen-Rhen, P. H. Williams, P. E. Pattison, and D. A. Caugant. 1986. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Infect. Immun.* 52:213-222.
 45. Selander, R. K., R. M. McKinney, T. S. Whittam, W. F. Bibb, D. J. Brenner, F. S. Nolte, and P. E. Pattison. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 163:1021-1037.
 46. Souza, V., L. Egulate, G. Avila, R. Capello, C. Gallardo, J. Montoya, and D. Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium elii* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1260-1268.
 47. Souza, V., T. T. Nguyen, R. R. Hudson, D. Piñero, and R. E. Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8389-8393.
 48. Stackebrandt, E., and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.
 49. Tibayrenc, M., F. Kjellberg, J. Arnaud, B. Oury, S. F. Brenière, M.-L. Dardé, and F. J. Ayala. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5129-5133.
 50. Torvik, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
 51. Urquiza, S., P. B. L. Botteon, and R. M. Boddey. 1989. Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ¹⁵N-labelled soil, p. 311-319. *In* F. A. Skinner, R. M. Boddey, and I. Fendrik (ed.), *Nitrogen fixation with non-legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
 52. Urquiza, S., K. H. S. Cruz, and R. M. Boddey. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56:105-114.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se han analizado en los estudios publicados que se muestran con anterioridad. Con la finalidad de evitar la redundancia, retomo solamente algunos aspectos para su discusión.

Bajo diversas estrategias experimentales se analizaron un total de 79 cepas de *A. diazotrophicus*. Estas se aislaron en su mayoría de distintas plantas y variedades de caña cultivadas en regiones distantes de México y Brasil, así como de la chinche harinosa, *Saccharicoccus sacchari*, asociada a la caña. También se incluyeron cepas aisladas de camote (*Ipomoea batatas*) y de pasto Camerun (*Pennisetum purpureum*).

El análisis electroforético de enzimas metabólicas ha mostrado una estrecha correlación con experimentos de homología DNA-DNA, sobre las estimaciones de relación genética de cepas o especies en diferentes taxa estudiados (Leung y col. 1994; Ochman y col. 1983; Segovia y col. 1991; Selander y col. 1985). En el presente estudio, estos métodos revelaron la existencia de 2 grupos fijadores de N₂ muy divergentes entre sí, correspondiendo, probablemente uno de ellos (ET 7), a una nueva especie dentro del género *Acetobacter*. Sin embargo, los patrones de RFLPs de los genes ribosomales de *A. diazotrophicus*, integran a ambos grupos en uno solo. Este resultado puede ser explicado sobre la base de la alta conservación de las secuencias de los genes 16S rDNA, por lo que este método resulta limitado en la diferenciación de especies muy cercanas. Esto se ha observado en especies como *R. tropici* y *A. rhizogenes*, las cuales no pueden ser diferenciadas por este método (Laguerre y col. 1994). Será necesario realizar diferentes estudios fisiológicos y genéticos para definir la posición taxonómica de las cepas agrupadas en el ET 7.

La diversidad genética entre las cepas típicas de *A. diazotrophicus*, alrededor de 0.060, (excluyendo las del ET 7), es mucho menor que la observada en la mayoría de las especies bacterianas estudiadas (Bottomley y col. 1994; Carlson y col. 1994; Caugant y col. 1986; Combe y col. 1994; Denny y col. 1988; Gilmour y col. 1987; Musser y col. 1985; Piñero y col. 1988; Selander y col. 1986). Probablemente la diversidad genética limitada en *A. diazotrophicus* puede estar relacionada con un origen evolutivo reciente. En forma alternativa puede relacionarse con el habitat predominantemente endófito de la bacteria, en asociación con la especialización de nicho, debido a que coloniza solamente plantas que almacenan sacarosa en altos niveles y que son propagadas en forma vegetativa (Döbereiner y col. 1993; Li y Macrae, 1991), así como a un insecto íntimamente asociado a la caña de azúcar (Ashbolt e Inkerman, 1990). Si bien estas hipótesis son probables, explicar certeramente el por qué de la variabilidad limitada en *A. diazotrophicus* no es posible, al menos con los datos existentes. Sin embargo, al conocer los niveles de diversidad genética en otras poblaciones bacterianas predominante o estrictamente endófitas, como *Herbaspirillum* (Baldani y col. 1992) y *Azoarcus* (Reinhold-Hurek y col. 1993), que viven bajo condiciones relativamente constantes, podría evaluarse la hipótesis del habitat y aportaría elementos sobre el papel que juegan las condiciones ambientales en la diversidad genética de las poblaciones.

El análisis genético reveló una estructura clonal en *A. diazotrophicus*, con una clona (ET 1) ampliamente predominante y extensamente distribuída entre todos los hospederos. La naturaleza endófito de la bacteria en relación con la propagación vegetativa de las plantas hospederas, así como el intenso intercambio comercial de variedades entre países, pudieran ser los factores que contribuyen a la amplia dispersión de *A. diazotrophicus*. La dispersión regional de esta especie bacteriana entre variedades de caña y otras plantas,

probablemente sea a través de las esporas de hongos micorrízicos (Paula y col. 1991), así como por el homóptero *S. sacchari*, el cual alberga solamente un subgrupo de la población de la caña de azúcar. Este resultado junto con el hecho de que *A. diazotrophicus* fué aislado sólo en 30 de 80 colonias del insecto, indican que este diazótrofo no es microbiota autóctona del homóptero como fue sugerido por Ashbolt e Inkerman (1990).

Se encontró una mayor diversidad genética entre un número similar de cepas de *A. diazotrophicus* aisladas de caña y *S. sacchari* colectados en Brasil que entre los de México. En tanto que 7 ETs se identificaron entre los aislados de Brasil, solamente uno, el ET 1, se aisló en México. Esta situación probablemente se encuentre relacionada con los muy diferentes niveles de fertilización nitrogenada aplicados al cultivo de la caña en estos dos países. Esta hipótesis se basa en la estrecha relación observada (Fuentes-Ramírez y col. 1993) entre el nivel de fertilización nitrogenada y la frecuencia de aislamiento de *A. diazotrophicus*. Se encontraron frecuencias no mayores a 2.5% en plantas fertilizadas con niveles de 300 Kg N/ha, incrementándose la frecuencia de aislamiento hasta 70% a partir de plantas fertilizadas con dosis de 120 Kg N/ha. Es probable que cambios en la fisiología de las plantas, al crecer con niveles de nitrógeno excesivos, sean responsables del efecto "selectivo" observado sobre la población de este diazótrofo. En bacterias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* el efecto negativo de altos niveles de nitrógeno sobre la infección de la planta es una situación bien conocida, pero aún en ausencia de infección estas especies logran sobrevivir saprofiticamente por largos períodos. Sin embargo, la naturaleza endófito de *A. diazotrophicus* implica dependencia de la planta, por lo que cambios en la fisiología del hospedero, probablemente reflejan los cambios observados en la población de este diazótrofo y tal vez en otras poblaciones de bacterias endófitas fijadoras de N₂ de cultivos

tradicionalmente fertilizados con altos niveles de nitrógeno.

Diferentes plásmidos son albergados por la mayoría de las cepas estudiadas con tamaños variables de 2.0 a 170 kb. La ausencia de plásmidos en algunas cepas, incluyendo la cepa tipo PAI 5^T, sugiere que las características fenotípicas fundamentales de *A. diazotrophicus*, así como la biosíntesis de ácido indol acético, son codificadas en el cromosoma. El hecho de que todas las cepas mostraran actividad para las enzimas ensayadas apoyan esta idea. Además, fue demostrado que tanto las cepas de *Acetobacter* de la especie fijadora de N₂ conocida, como las del nuevo grupo e independientemente de la presencia de plásmidos, todas las cepas comparten un patrón de organización común de los genes *nif* estructurales. Esto indica que los genes responsables de la fijación de N₂ están localizados a nivel cromosomal. Los resultados no permiten atribuir alguna función a los plásmidos. Sin embargo, debido a que la mayoría de las cepas mantienen al menos un plásmido altamente conservado, parece probable que estos elementos confieran alguna ventaja a las cepas que los albergan, como ha sido observado en diferentes especies bacterianas que se asocian con plantas (Bender y Cooksey, 1986; Comai y Kosuge, 1980; Coplin y col. 1981; Martínez y col. 1990). Es importante hacer notar que la mayoría de las cepas agrupadas en el predominante ET 1 mantienen un plásmido altamente conservado (pAd 170). Dos cepas de este linaje no albergan al pAd 170 pero sí un plásmido de 93 kb, existiendo entre ellos alta homología. Cepas de *A. diazotrophicus* aisladas en muy baja frecuencia y agrupadas en linajes diferentes al ET 1, no albergan al pAd 170. Este hecho sugiere la posibilidad de que el pAd 170 juegue un papel importante en la asociación con las plantas hospederas de *A. diazotrophicus*, particularmente al crecer frente altos niveles de fertilizante nitrogenado y por esta razón la amplia predominancia y distribución del ET 1.

Desde un punto de vista de aplicación biotecnológica será importante

determinar si las cepas representadas por el predominante ET 1, en comparación a las cepas agrupadas en otros linajes, pueden ser más eficientes en la promoción del crecimiento de las plantas hospederas, ya sea a través del aporte de nitrógeno (Boddey y col. 1991; Urquiaga y col. 1989), por efectos directos del ácido indol acético sobre la fisiología de la planta (Fuentes-Ramírez y col. 1993) o simplemente, el ET 1 es un linaje altamente "exitoso" adaptado a diferentes hospederos. Aún cuando el ET 1 fuera solamente un linaje "exitoso", su amplia capacidad colonizadora abre otras perspectivas biotecnológicas interesantes. Por ejemplo, mediante la clonación en *A. diazotrophicus* de los genes responsables de la síntesis de la toxina bioinsecticida de *B. thuringiensis*, para el control del gusano barrenador de la caña y otras importantes plagas que disminuyen el rendimiento del cultivo.

Como una contribución al conocimiento de la biología de las poblaciones bacterianas, será de interés conocer si la diversidad genética limitada que se observó en *A. diazotrophicus* es una constante en otras poblaciones bacterianas endófitas.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION

I. Sobre la bacteria

1. Determinar si existen diferencias entre los distintos linajes clonales (ETs) de *A. diazotrophicus*, en su capacidad de fijar N₂ frente a diversas concentraciones y formas de nitrógeno combinado.
2. Determinar la posición taxonómica del nuevo grupo (ET 7) detectado en este estudio, mediante el uso de la taxonomía numérica, quimiotaxonomía y análisis genético-molecular.

II. Sobre la asociación bacteria-planta

1. Determinar si los niveles de nitrógeno combinado y formas de éste influyen sobre la capacidad de cada uno de los diferentes linajes clonales de *A. diazotrophicus* para colonizar la caña de azúcar, evaluando también su capacidad de contribución de N a la planta, así como en la promoción del crecimiento de la misma debido a posibles efectos auxínicos.
2. Evaluar específicamente el papel del pAd 170 en la asociación de *A. diazotrophicus* con plantas fertilizadas con diferentes niveles y formas de nitrógeno combinado.
3. Determinar la capacidad de los diferentes linajes de *A. diazotrophicus*, especialmente el correspondiente al ET 1, para colonizar otras plantas ricas en sacarosa, entre ellas la remolacha azucarera y el sorgo sacarino, evaluando además, la posible contribución de la FBN en la economía del N de la planta.

III. Sobre aplicaciones biotecnológicas de la bacteria

1. Llevar a cabo la clonación en *A. diazotrophicus* de los genes responsables de la síntesis de la toxina bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis*, para el control de algunas de las más importantes plagas de la caña de azúcar (V. gr., gusanos barrenadores), aprovechando la amplia capacidad colonizadora de las cepas agrupadas en el ET 1, así como su naturaleza predominantemente endófito.
2. Determinar la posibilidad de enriquecer con N derivado de la FBN alimento para consumo animal, fabricado comercialmente a base de bagazo de caña y melazas de esta industria, aprovechando que las características del alimento son el sustrato sobre el que desarrolla naturalmente *A. diazotrophicus*.

IV. Sobre la diversidad genética de poblaciones

1. Determinar si la diversidad genética limitada que se observa en *A. diazotrophicus* se presenta en otras poblaciones de bacterias predominante o estrictamente endófitas como *Herbaspirillum* y *Azoarcus*.

CONCLUSIONES

La comparación de los niveles de diversidad genética entre las poblaciones bacterianas ubica a *A. diazotrophicus* entre las menos variables genéticamente. Intentar explicar el porqué la diversidad genética limitada en esta especie, parece imposible. Sin embargo, el conocer este hecho sugiere que otras poblaciones endófitas, que viven bajo condiciones ambientales relativamente constantes, también pudiesen ser genéticamente poco variables. El demostrar esta situación aportará elementos sobre el papel que juegan las condiciones ambientales en la diversidad genética de las poblaciones.

Aparentemente el nitrógeno aplicado en exceso como fertilizante al cultivo de la caña de azúcar ejerce un efecto selectivo sobre la población de *A. diazotrophicus*. ¿Será este efecto una constante en los cambios de población de otros diazótrofos endófitos, llegando al grado de eliminar a algunas poblaciones, e incluso haber ya eliminado a algunas? Sería valioso iniciar la búsqueda de poblaciones endófitas en las plantas progenitoras de los actuales cultivos de importancia agrícola, por ejemplo en Teozintle, progenitor del maíz o en líneas ancestrales de maíz cultivadas sin fertilizantes en algunas regiones indígenas de nuestro país.

Con algunos de los resultados obtenidos en este trabajo, considero que la investigación a realizarse sobre la asociación *A. diazotrophicus*-caña de azúcar será facilitada, por ejemplo, evaluando ahora no decenas, sino solamente unas cuantas cepas representativas de los diferentes linajes y seleccionando para su empleo como inoculante aquella(s) que muestre(n) la mayor capacidad colonizadora, de fijación de N_2 y promoción del crecimiento de la caña.

Indudablemente, estudiar la diversidad genética de las poblaciones bacterianas no significa solamente describir nuevas especies o relaciones entre cepas de una taxón particular, vá más allá, aporta valiosa información que puede contribuir al uso racional de los microorganismos como fuente inagotable de recursos renovables.

REFERENCIAS

1. Arias, D.E., I.M. Gatti, D.M. Silva, A.P. Ruschel and P.B. Vose. 1978. Primeras observaciones al microscopio electrónico de bacterias fijadoras de N₂ en la raíz de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L.). Turrialba **28**:203-210.
2. Ashbolt, N.J. and P.A. Inkerman. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. Appl. Environ. Microbiol. **56**:707-712.
3. Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, F. Olivares and J. Döbereiner. 1992. Identification and Ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis **13**:65-73.
4. Baldani, J.I., R.W. Weaver, M.F. Haynes and B.D. Eardly. 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2308-2314.
5. Barea, J.M., E. Navarro and E. Montoya. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. J. Appl. Bacteriol. **40**:129-134.
6. Bauer, W.D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol. **32**:407-449.
7. Beltran, P., J.M. Musser, R. Helmuth, J.J. Farmer III, W.M. Frerichs, I.K. Wachsmuth, K. Ferris, A.C. McWhorter, J.G. Wells, A. Cravioto and R.K. Selander. 1988. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: Genetic diversity and relationship among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**:7753-7757.

8. Bender, C.L. and D.A. Cooksey. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *J. Bacteriol.* **165**:534-541.
9. Bloom, R.A., B.C. Mullin and R.L. Tate III. 1989. DNA restriction patterns and DNA-DNA solution hybridization studies of *Frankia* isolates from *Myrica pensylvanica* (Bayberry). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2155-2160.
10. Boddey, R.M., S. Urquiaga, V. Reis and J. Dobereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant and Soil* **137**:111-117.
11. Boerlin, P. and J.C. Piffaretti. 1991. Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1624-1629.
12. Bohlool, B., J. Ladha, D. Garrity and T. George. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. *Plant and Soil* **141**:1-11.
13. Bottomley, P.J. 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. p. 293-348. En: *Biological nitrogen fixation*. G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans (eds). Chapman Hall, Inc. New York.
14. Bottomley, P.J., H-H. Cheng and S.R. Strain. 1994. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1754-1761.
15. Brockman, F.J. and D.F. Bezdicek. 1989. Diversity within serogroups of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* in the palouse region of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance, and topography. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:109-115.

16. Brown, A.H.D. and M.W. Feldman. 1981. Population structure of multilocus associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:5913-5916.
17. Caballero-Mellado, J., M.G. Carcaño-Montiel and M.A. Mascarúa-Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* **13**:243-253.
18. Campbell, A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**:55-83.
19. Cann, D.D. and M.E. Wilcox. 1965. Analysis of multimolecular enzymes as an aid to the identification of certain rapidly growing mycobacteria using starch gel electrophoresis. *J. Appl. Bacteriol.* **28**:165-173.
20. Carlson, C.R., D.A. Caugant and A.B. Kolsto. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1719-1725.
21. Caugant, D.A., K. Bovre, R. Gaustad, K. Bryn, E. Holten, E.A. Hoiby and L.O. Froholm. 1986a. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J. Gen. Microbiol.* **132**:641-652.
22. Caugant, D.A., Froholm, L.O., K. Bovre, E. Holten, C.E. Frasch, L.F. Mocca, W.D. Zollinger and R.K. Selander. 1986b. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4927-4931.
23. Caugant, D.A., B.R. Levin and R.K. Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics* **98**:467-490.

24. Caugant, D.A., L.F. Mocca, C.E. Frasch, L.O. Froholm, W.A. Zollinger and R.K. Selander. 1987. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype and outer membrane protein pattern. *J. Bacteriol.* **169**:2781-2792.
25. Cavalcante, V.A. and J. Döbereiner. 1988. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* **108**:23-31.
26. Charles, T.C., R.S. Singh and T.M. Finan. 1990. Lactose utilization and enzymes encoded by megapasmids in *Rhizobium meliloti* SU47: implications for population studies. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2497-2502.
27. Clark-Curtiss, J.E. and G.P. Walsh. 1989. Conservation of genomic sequences among isolates of *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* **171**:4844-4851.
28. Cojho, E.H., V.M. Reis, A.C.G. Schenberg and J. Döbereiner. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**:341-346.
29. Comai, L. and T. Kosuge. 1980. Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bacteriol.* **143**:950-957.
30. Combe, M.L., J.L. Pons, R. Sesboue and J.P. Martin. 1994. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets, a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:26-30.
31. Coplin, D.L. 1989. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**:187-212.
32. Coplin, D.L., R.G. Rowan, D.A. Chisholm and R.E. Whitmoyer. 1981. Characterization of plasmids in *Erwinia stewartii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:599-604.
33. Curl, E.A. and B. Truelove. 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag. Berlin. 288p.

34. DeFlaun, M.F. and S.B. Levy. 1989. Genes and their varied hosts. p. 1-32. En: Gene transfer in the environment. S.B. Levy and R.V. Miller (eds). McGraw-Hill Publishing Company. New York.
35. De Ley, J., M. Gillis and J. Swings. 1984. Family VI. *Acetobacteraceae* 1980, 23. p. 267-278. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N.R. Krieg and J.G. Holt (eds). Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
36. Denny, T.P. 1988. Phenotypic diversity in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. J. Gen. Microbiol. **134**:1939-1948.
37. Denny, T.P., M.N. Gilmour and R.K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationship of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. J. Gen. Microbiol. **134**:1949-1960.
38. Derylo, M., M. Glowacka, A. Skorupska and Z. Lorkiewicz. 1981. Nif Plasmid from *Lignobacter*. Arch. Microbiol. **130**:322-324.
39. Diem, H.G., D. Gauthier and Y.R. Dommergues. 1983. An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. Can. J. Bot. **61**:2815-2821.
40. Döbereiner, J. 1961. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx. in the rhizosphere of sugar cane. Plant and Soil **15**:211-216.
41. Döbereiner, J., I.E. Marriel and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. **22**:1464-1473.
42. Döbereiner, J. and F.P. Pedrosa. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. Springer-Verlag. Berlin. 155 p.
43. Döbereiner, J., V.M. Reis and C. Lazarini. 1988. New N₂ fixing bacteria in association with cereals and sugar cane. En: Nitrogen fixation: Hundred years after. H. Bothe, F.J. De Bruijn, and W.E. Newton (eds). Gustav Fischer. Stuttgart.

44. Döbereiner, J., V.M. Reis, M.A. Paula and F. Olivares. 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. p. 671-676. En: New Horizons in nitrogen fixation. R. Palacios, J. Mora and W.E. Newton (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands.
45. Dykhuizen, D.E. and L. Green. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of a biological species. *J. Bacteriol.* **173**:7257-7268.
46. Fani, R., M. Bazzicalupo, E. Gallori, L. Giovannetti, S. Ventura and M. Polsinelli. 1991. Restriction fragment length polymorphism of *Azospirillum* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**:225-230.
47. Farrand, S.K. 1989. Conjugal transfer of bacterial genes on plants. p. 261-285. En: Gene transfer in the environment. S.B. Levy and R.V. Miller (eds). McGraw-Hill Publishing Company. New York.
48. Fisher, R.F. and S.R. Long. *Rhizobium*-plant signal exchange. 1992. *Nature* **357**:655-660.
49. Flores Cáceres, S. Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcoholera. México, D. F.
50. Flores Cáceres, S. y M. Abarca Ruano. 1961. Principales plagas de la caña de azúcar en México. Instituto para el mejoramiento de la producción de azúcar. México.
51. Flores, M., V. González, M.A. Pardo, A. Leija, E. Martínez, D. Romero, D. Piñero, G. Dávila and R. Palacios. 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **170**:1191-1196.
52. Fuentes-Ramírez, L.E., T. Jiménez-Salgado, I.R. Abarca-Ocampo and J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil* **154**:145-150.

53. Fuerst, P.A., K.P. Poetter, C. Pretzman and P.S. Perlman. 1990. Molecular genetics of populations of intracellular bacteria: the spotted fever group Rickettsiae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **590**:430-438.
54. Gabriel, D.W., J.E. Hunter, M.T. Kingsley, J.W. Miller and G.R. Lazo. 1988. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:59-65.
55. Gargallo-Viola, D. 1989. Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:860-868.
56. Gaskins, M.H., S.L. Albrecht and D.H. Hubbell. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. *Agric. Ecos. Environ.* **12**:99-116.
57. Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R.M. Kroppenstedt, M.P. Stephan, K.R.S. Teixeira, J. Döbereiner and J. De Ley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:361-364.
58. Gilmour, M.N., T.S. Whittam, M. Kilian and R.K. Selander. 1987. Genetic relationship among the oral streptococci. *J. Bacteriol.* **169**:5247-5257.
59. Glynn, P., P. Higgins, A. Squartini and F. O'Gara. 1985. Strain identification in *Rhizobium trifolii* using DNA restriction analysis, plasmid DNA profiles and intrinsic antibiotic resistances. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**:177-182.
60. Goulet, Ph. 1980. Distinctive electrophoretic patterns of esterases from *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* and *E. gergoviae*. *J. Gen. Microbiol.* **117**:483-491.

61. Goulet, Ph. and B. Picard. 1984. Distinctive electrophoretic and isoelectric focusing patterns of esterases from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* **130**:1471-1480.
62. Graham, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crops Res.* **4**:93-112.
63. Graham, P.H., J. Bale, D. Baker, M. Fried, J. Roskoski, K.T. Mackay and E. Craswell. 1988. The contribution of biological nitrogen fixation to plant production: An overview of the symposium and its implications. *Plant and Soil* **108**:1-6.
64. Grosskinsky, C., W.R. Jacobs, Jr., J.E. Clark-Curtis and B.R. Bloom. 1989. Genetic relationships between *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, and candidate leprosy vaccine strains by DNA hybridization: identification of an *M. leprae*-specific repetitive sequence. *Infect. Immun.* **57**:1535-1541.
65. Hartl, D.L., M. Medhora, L. Green and D.E. Dykhuizen. 1986. The evolution of DNA sequences in *Escherichia coli*. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **312**:191-204.
66. Hedrick, P.W., M.E. Ginevan and E.P. Ewing. 1976. Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **7**:1-32.
67. Hegazi, N, N. Eid, R. Farag, and M. Monib. 1979. Asymbiotic N₂-fixation in the rhizosphere of sugar cane planted under semi-arid conditions of Egypt. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* **17**:501-507.
68. Henzell, E.F. 1988. The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil* **108**:15-21.
69. Hildebrand, D.C., M.N. Schroth and O.C. Huisman. 1982. The DNA homology matrix and non-random variation concepts as the basis for the taxonomic treatment of plant pathogenic and other bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**:235-256.

70. Howard, D.J., G.L. Bush and J.A. Breznak. 1985. The evolutionary significance of bacteria associated with *Rhagoletis*. *Evolution* **39**:405-417.
71. Hubbell, D.H. and M.H. Gaskins. 1984. Associative N₂ with *Azospirillum*. p. 201-224. En: Biological nitrogen fixation. Ecology, technology and physiology. M. Alexander (ed). Plenum Press. New York and London.
72. INEGI. 1992. El sector alimentario en México. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
73. Istock, C.A., K.E. Duncan, N. Ferguson and X. Zhou. 1992. Sexuality in a natural population of bacteria- *Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol. Ecol.* **1**:95-103.
74. Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* **64**:25-30.
75. Koike, H. 1968. Leaf scald of sugarcane in continental United States -A first report. *Plant Dis. Repr.* **52**:646-649.
76. Krawiec, S. and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.* **54**:502-539.
77. Laguerre, G., M.-R. Allard, F. Revoy and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:56-63.
78. Lazo, G.R., R. Roffey and D.W. Gabriel. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:214-221.

79. Leung, K., S.R. Strain, F.J. De Bruijn and P.J. Bottomley. 1994. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within and indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:416-426.
80. Levin, B.R. 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. *Genetics* **99**:1-23.
81. Li, R.P. and I.C. Macrae. 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* **23**:999-1002.
82. Libbert, E., S. Whichner, U. Schiewer, H. Risch and W. Kaiser. 1966. The influence of epiphytic bacteriae on auxin metabolism. *Planta (Berl.)* **68**:327-334.
83. Liu, M.C. 1984. Sugarcane. p. 572-605. En: *Handbook of plant cell culture*. W.R. Sharp, D.A. Evans and Y. Yamada (eds). Macmillan Publishing Co.
84. Liu, S.T., K.L. Perry, C.L. Schardl and C.I. Kado. 1982. *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:2812-2816.
85. López-Reyes, L., L. Soto-Urzúa, M.A. Mascarúa-Esparza, I. Herrera-Camacho and J. Caballero-Mellado. 1989. Antibiotic resistance and B-lactamase activity in *Azospirillum*. *Soil Biol. Biochem.* **21**:651-655.
86. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbial. Rev.* **58**:563-602.
87. Lund, B.M. 1965. A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble proteins components and sterease enzymes of some group D streptococci. *J. Gen. Microbiol.* **40**:413-419.
88. Lynch, J.M. 1990. Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotech. Adv.* **8**:335-346.

89. Magariños, B., J.L. Romalde, I. Bandín, B. Fouz and A.E. Toranzo. 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3316-3322.
90. Margulis, L., D. Chase and R. Guerrero. 1986. Microbial communities. *BioScience* **36**:160-170.
91. Martínez Arroyo, J. Centro Experimental del Instituto Mexicano para la producción de azúcar. Izucar de Matamoros, Puebla.
92. Martínez, E. and R. Palacios. 1984. Is it necessary to improve nitrogen fixation of bean in agricultural fields in Mexico? p. 60. En: *Advances in nitrogen fixation research*. C. Veeger and W.E. Newton (eds). Martinus Nijhoff. The Hague.
93. Martínez, E., D. Romero and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**:59-93.
94. Martínez-Romero, E. 1994. Recent development in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil* **161**:11-20.
95. Mascarúa-Esparza, M.A., R. Villa-González. and J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. *Plant and Soil* **106**:91-95.
96. Mavingui, P., G. Laguerre, O. Berge and T. Heulin. 1992. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1894-1903.
97. Maynard Smith, J., C.G. Dowson and B.G. Spratt. 1991. Localized sex in bacteria. *Nature* **349**:29-31.
98. Maynard Smith, J., N.H. Smith, M. O'Rourke and B.G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4384-4388.

99. McArthur, J.V., D.A. Kovacic and M.H. Smith. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9621-9624.
100. McCarley, E. and R.J. Rennie. 1980. A computer program to interpret chemical tests to identify dinitrogen-fixing soil bacteria. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* **17**:501-507.
101. Michiels, K., J. Vanderleyden and A. Van Gool. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: A review. *Biol. Fertil. Soils* **8**:356-368.
102. Milkman, R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* **182**:1024-1026.
103. Milkman, R. and M.M. Bridges. 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics* **126**:505-517.
104. Minjárez Castro, J.M. Ingenio El Carmen, S. A. de C. V. Córdoba, Ver.
105. Moreno, E., E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch and H. Mayer. 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J. Bacteriol.* **172**:3569-3576.
106. Mozo, T., E. Cabrera and T. Ruiz-Argüeso. 1988. Diversity of plasmid profiles and conservation of symbiotic nitrogen fixation genes in newly isolated *Rhizobium* strains nodulating Sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1262-1267.
107. Mulder, E.G., T.A. Lie and A. Houwers. 1977. The importance of legumes under temperate conditions. p. 221-242. En: A treatise on dinitrogen fixation. Section IV. *Agronomy and Ecology*. Hardy R.W.F. and Gibson, A.M. (eds). John Willey.

108. Musser, J.M., D.A. Bemis, H. Ishikawa and R.K. Selander. 1987a. Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* **169**:2793-2803.
109. Musser, J.M., D.M. Granoff, P.E. Pattison and R.K. Selander. 1985. A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5078-5082.
110. Musser, J.M., E.L. Hewlett, M.S. Peppler and R.K. Selander. 1986. Genetic diversity and relationship in populations of *Bordetella* spp. *J. Bacteriol.* **166**:230-237.
111. Musser, J.M., J.S. Kroll, E.R. Moxon and R.K. Selander. 1988. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **56**:1837-1845.
112. Musser, J.M., V.J. Rapp and R.K. Selander. 1987b. Clonal diversity in *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **55**:1207-1215.
113. Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
114. Nei, M. and W.-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5269-5273.
115. Nelson, K., T.S. Whittam and R.K. Selander. 1991. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6667-6671.
116. Nickell, L.G. 1983. Sugarcane. En: *Plant growth regulating chemicals*. L.G. Nickell (Ed). CRC press, Inc. Boca Raton, Flo. pp. 185-205.
117. Norrung, B. and N. Skovgaard. 1993. Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2817-2822.

118. Oaks, A. 1992. A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *BioScience* **42**:103-111.
119. O'Brien, S.J., J.M. Simonson, M.W. Grabowski and M.F. Barilé. 1981. Analyses of multiple isoenzyme expression among twenty-two species of *Mycoplasma* and *Acholeplasma*. *J. Bacteriol.* **46**:222-232.
120. Ochman, H., T.S. Whittam, D.A. Caugant and R.K. Selander. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2715-2726.
121. Okon, Y. and Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil* **90**:3-16.
122. Okon, Y. and C.A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1591-1601.
123. O'Rourke, M. and E. Stevens. 1993. Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non-clonal pathogen. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2603-2611.
124. Patriquin, D.G., L.A. Gracioli and A.P. Ruschel. 1980. Nitrogenase activity of sugar cane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite. *Soil Biol. Biochem.* **12**:413-417.
125. Paturau, J.M. 1988. Alternative uses of sugarcane and its byproducts in agroindustries. p. 24-44. En: R. Sansourey, G. Aarts and T.R. Preston (eds), *Sugarcane as feed*. Food and Agriculture Organization of United Nations. Rome.

126. Paula, M.A., V.M. Reis and J. Döbereiner. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fertil. Soils* **11**:111-115.
127. Pimentel, J.P., F.L. Olivares, R.M. Pitard, S. Urquiaga, F. Akiba and J. Döbereiner. 1991. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil* **137**:61-65.
128. Piñero, D., E. Martínez and R.K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2825-2832.
129. Plazinski, J., P.J. Dart, and B.G. Rolfe. 1983. Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. *J. Bacteriol.* **155**:1429-1433.
130. Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vacanneyt, K. Kersters and J. De Ley. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptocloa fusca* L. Kunth), and description of two species: *Azoarcus indigenes* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:574-584.
131. Rennie, R.J., J.R. de Freitas, P. Ruschel and P.B. Vose. 1982. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Can. J. Microbiol.* **28**:462-467.
132. Römling, U., J. Wingender, H. Müller and B. Tümmler. 1994. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1734-1738.

133. Ruschel, A.P. 1981. Associative N₂-fixation by sugar cane. p. 82-90. En: Associative N₂-fixation. Vose, P.B. and Ruschel, A.P. (eds). CRC Press, Inc. Florida.
134. Ruschel, A.P., Y. Henis and E. Salati. 1975. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings Soil Biol. Biochem. **7**:181-182.
135. Ruschel, A.P. and P.B. Vose. 1984. Biological nitrogen fixation in sugar cane. p. 219-235. En: Current developments in biological nitrogen fixation. N.S. Subba Rao (ed). Edward Arnold (Publishers), Ltd. London.
136. Sadowsky, M.J., B.B. Bohlool and H.H. Keyser. 1987. Serological relatedness of *Rhizobium fredii* to other rhizobia and to the Bradyrhizobia. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1785-1789.
137. Sampaio, E.V.S.B., I.H. Salcedo and J. Bettany. 1984. Dinamica de nutrientes em cana-de-acucar. I. Eficiencia na utilizacao de ureia (N) em aplicacao unica ou parcelada. Pesq. Agropec. Bras. **19**:943-949.
138. Schanck, S.C., R.L. Smith and R.C. Littell. 1983. Establishment of associative N₂-fixing Systems. Soil Crop. Sci. Flo. **42**:113-117.
139. Schill, W.B., S.R. Phelps and S.W. Pyle. 1984. Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. Appl. Environ. Microbiol. **48**:975-979.
140. Schlaman, H.R.M., R.J.H. Okker and B.J.J. Lugtenberg. 1992. Regulation of nodulation gene expression by nodD in rhizobia. J. Bacteriol. **174**:5177-5182.
141. Schlegel, H.G. and H.W. Jannasch. 1992. Prokaryotes and their habitats. p. 75-125. En: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Eds). Springer-Verlag. New York.

142. Schleifer, K.H. and E. Stackebrandt. 1983. Molecular Systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:143-187.
143. Schofield, P.R., A.H. Gibson, W.F. Dudman and J.W. Watson. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2942-2947.
144. Scholz, B.K., J.L. Jakobek and P.B. Lindgren. 1994. Restriction fragment length polymorphism evidence for genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1093-1100.
145. Schroth, M.N. and J.G. Hancock. 1981. Disease suppressive soils and root-colonizing bacteria. *Science* **216**:1376-1381.
146. Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios and E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:426-433.
147. Segovia, L., J.P.W. Young and 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.
148. Selander, R.K., P. Beltran, N.H. Smith, R. Helmuth, F.A. Rubin, D.J. Kopecko, K. Ferris, B.D. Tall, A. Cravioto and J.M. Musser. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* **58**:2262-2275.
149. Selander, R.K., D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour and T.S. Wittam. 1986a. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:873-884.

150. Selander, R.K., D.A. Caugant and T.S. Whittam. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. p. 1625-1648. En: Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
151. Selander, R.K., T.K. Korhonen, V. Vaisanen-Rhen, P.H. Williams, P.E. Pattison and D.A. Caugant. 1986b. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Infect. Immun.* **52**:213-222.
152. Selander, R.K. and B.R. Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* **210**:545-547.
153. Selander, R.K., R.M. McKinney, T.S. Whittam, W.F. Bibb, D.J. Brenner, F.S. Nolte and P.E. Pattison. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **163**:1021-1037.
154. Singh, M., A. Kleeberger and W. Klingmüller. 1983. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol. Gen. Genet.* **190**:373-378.
155. Souza, V., L. Eguiarate, G. Avila, R. Capello, C. Gallardo, J. Montoya and D. Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1260-1268.
156. Souza, V., T.T. Nguyen, R.R. Hudson, D. Piñero and R.E. Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8389-8393.

157. Stackebrandt, E. 1992. Unifying phylogeny and phenotypic diversity. p. 19-47. En: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (eds). Springer-Verlag. New York.
158. Stephan, M.P., M. Oliveira, K.R. Teixeira, G. Martinez-Drets and J. Döbereiner. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. **77**:67-72.
159. Strzelczyk, E. and P. Burdziej. 1984. Production of auxine and giberellin-like substance by mycorrhized fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soils and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). Plant and Soil **81**:185-194.
160. Swings, J. 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. p. 2268-2286. En: The prokaryotes. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (eds). Springer-Verlag. New York.
161. Thomas, P.M., K.F. Golly, J.W. Zyskind and R.A. Virginia. 1994. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. Appl. Environ. Microbiol. **60**:1146-1153.
162. Tibayrenc, M., F. Kjellber, J. Arnaud, B. Oury, S.F. Brenière, M.-L. Dardé and F.J. Ayala. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:5129-5133.
163. Tien, T.M., M.H. Gaskins and D.H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. **37**:1016-1024.

164. Torsvik, V., J. Goksoyr and F. L. Daac. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:782-787.
165. Trüper H.G. and K.-H. Schleifer. 1992. Prokaryote characterization and identification. p. 126-148. En: *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications.* A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (eds). Springer-Verlag. New York.
166. Urquiaga, S. and R.M. Boddey. 1987. Theoretical considerations in the comparison of total nitrogen difference and N isotope dilution estimates of the contribution of nitrogen fixation to plant nutrition. *Plant and Soil* **102**:291-294.
167. Urquiaga, S., P.B.L. Botteon and R.M. Boddey. 1989. Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ¹⁵N-labelled soil. p. 311-319. En: *Nitrogen fixation with non-legumes.* F.A. Skinner, R.M. Boddey, and I. Fendrik (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands.
168. Urquiaga, S., K.H.S. Cruz and R.M. Boddey. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Am. J.* **56**:105-114.
169. Vázquez-Cruz, C., A. Tapia-Hernández, M.A. Mascarúa-Esparza, J. Caballero-Mellado and B.E. Baca. 1992. Plasmid profile modification after elimination of bacteriocin activity in *Azospirillum brasilense* strains. *Microbios* **69**:195-204.
170. Vincent, J.M. 1974. Root nodule symbioses with *Rhizobium*. p. 265-341. En: *The biology of nitrogen fixation.* A. Quispel (ed). North Holland Publishing Co. Amsterdam.

171. Vincent, J.M. 1977. *Rhizobium*: general microbiology. En: A treatise on dinitrogen fixation. Section III. Biology. R.W.F. Hardey and W.S. Silver (eds). John Wiley & Sons. New York, London.
172. Whittam, T.S., H. Ochman and R.K. Selander. 1983a. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**:1751-1755.
173. Whittam, T.S., H. Ochman and R.K. Selander. 1983b. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. Mol. Biol. Evol. **1**:67-83.
174. Willems, A. and M.D. Collins. 1993. Phylogenetic analyses of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**:305-313.
175. Williams, S.T., M.E. Sharp and J.G. Holt (eds). 1984. Bergey's manual of Systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore.
176. Yamada, Y. and M. Akita. 1984. An electrophoretic comparison of enzymes in strains of *Gluconobacter* species. J. Gen. Microbiol. **30**:115-126.
177. Yoo, I.D., T. Fujii, Y. Sano, K. Komagata, T. Yoneyama, S. Iyama and Y. Hirota. 1986. Dinitrogen fixation of rice-*Klebsiella* associations. Crop Sci. **26**:297-301.
178. Young, J.P.W. and M. Wexler. 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. **134**:2731-2739.
179. Zahner, V., H. Momen, C.A. Salles and L. Ravinovitch. 1989. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol. **67**:275-282.

180. Zhou, J. and B.G. Spratt. 1992. Sequence diversity within the *argF*, *fbp* and *recA* genes of natural isolates of *Neisseria meningitidis*: interspecies recombination within the *argF* gene. *Molec. Microbiol.* **6**:2135-2146.

A N E X O No. 1

***Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México**

L.E. FUENTES-RAMIREZ, T. JIMENEZ-SALGADO, I.R. ABARCA-OCAMPO and J. CABALLERO-MELLADO¹

Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Apartado Postal No. 1622, Puebla, Pue. México, C.P. 72000; ¹To whom correspondence should be sent. Present address: Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Mor. México

Received 9 February 1993. Accepted in revised form 4 June 1993

Key words: auxins, diazotrophic bacteria, endophytic bacteria, sugarcane

Abstract

Thirteen cane cultivars grown on fields in México were sampled to assess the occurrence of *Acetobacter diazotrophicus*, a recently identified N₂-fixing bacterium. Results showed that the isolation frequencies extended over a broad range (1.1 to 67%), likely to be related to the nitrogen fertilization level. The lowest isolation frequencies (1.1 to 2.5%) were obtained from plants growing at high nitrogen doses (275–300 kg ha⁻¹) and the highest values (10–67%) from plants cultivated with 120 kg N ha⁻¹. All eighteen strains of *A. diazotrophicus* produced indoleacetic acid (IAA) in defined culture medium. Estimates obtained from HPLC analyses revealed that *A. diazotrophicus* strains produced from 0.14 to 2.42 µg IAA mL⁻¹ in culture medium. Considering that *A. diazotrophicus* is found within the plant tissue, the biosynthesis of IAA suggests that the bacteria could promote rooting and improve sugarcane growth by direct effects on metabolic processes, in addition to their role in N₂ fixation.

Introduction

Nitrogen fixing bacteria are commonly found in association with the roots of diverse plants. Frequently several species of diazotrophs can be isolated from the same plant (Patriquin et al., 1983), but according to the technique used the type of bacteria differs (Balandreau, 1983). Thus, Döbereiner (1961) found *Beijerinckia* spp. in 95% of the rhizosphere soil samples of sugarcane. Prevalence of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere of sugarcane was reported (Zafar et al., 1986). Rennie et al. (1982) isolated *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola* and *Bacillus polymyxa*, from inside sett and roots of sugarcane, but neither *Beijerinckia* nor *Azotobacter* spp. were found.

Although several nitrogen-fixing bacteria have been isolated from sugarcane, it still remains unknown which of these bacteria are the most important in the plant-associated biological nitrogen fixation.

Recently, *Acetobacter diazotrophicus*, a N₂-fixing bacterium has been isolated from sugarcane roots and inside stems collected in various sites of Brazil (Cavalcante and Döbereiner, 1988) and of Australia (Li and Macrae, 1991). Since this bacterium is able to fix N₂ even in presence of nitrates and it seems best adapted to the sugarcane environment (Cavalcante and Döbereiner, 1988), it could have more economic importance compared with other diazotrophs associated with sugarcane.

The ability to synthesize auxins has been

described in different epiphytic bacteria (Libbert and Risch, 1969) and soil microorganisms (Brown, 1972; Prikryl et al., 1985), including several diazotrophic bacteria (Barea and Brown, 1974; Clark, 1974; Tien et al., 1979). It has also been shown that epiphytic bacteria could increase the IAA content in the plant (Libbert et al., 1966). It is possible that diazotrophs living at the plant surface or as endophytic bacteria may improve plant productivity either by the involvement of plant growth-regulating substances, by supplying nitrogen, or by both.

This work was conducted to assess the occurrence of the endophytic bacterium *A. diazotrophicus* in roots and stems of different sugarcane cultivars sown in México. Also, we report for the first time the production of indoles by *A. diazotrophicus* cultured strains.

Material and methods

Locations and sugarcane samples

Three complete plants, with various stems each one, were collected from several sugarcane varieties during the years 1990–1991 in different cultivated areas of México (Table 1). Whole plants were sampled by excavating the roots to a depth of 25–30 cm. Collection from each farm was done from cane plants growing for 7–10 months, to a distance of 25 m between plants.

Media

N-free-semisolid acetic LGI medium (SA-LGI) complemented with sugarcane juice at pH 4.5 (Cavalcante and Döbereiner, 1988) was used as an enrichment culture for *Acetobacter diazotrophicus*. For isolation and pure cultures, acetic LGI agar plates (pH 4.5) supplemented with yeast extract (50 mg L^{-1}) and cycloheximide (150 mg L^{-1}) were used. Also, potato agar plates with 10% cane sugar were used. Inocula for the determination of indole compounds were grown in glucose-yeast extract (GYC) broth (De Ley et al., 1984) without CaCO_3 . To determine extracellular indole compounds synthesized by *A.*

diazotrophicus isolates, the cultures were grown at pH 6.0 in liquid LGI medium, replacing crystallized cane sugar by 1.0% sucrose (analytical grade) and supplemented with 0.1% NH_4Cl . The medium was supplemented with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ filter-sterilized tryptophan. All other media were sterilized at 121°C for 20 min.

Isolation

Sugarcane root samples (three per each cultivar) were rinsed with tap water until the liquid was clear; then, the roots were washed with sterile distilled water. Subsequently, roots were immersed in 1% Chloramine T for 5 min, followed by washing in 25 mM phosphate buffer and by four changes of sterile water. The surface disinfected samples were macerated in a blender at high speed for 2 min in cold sterile sugar solution (5%), to give a 1/4 (w/v) dilution. Nine stems of each cultivar were divided into basal, intermediate and apical regions, in relation to distance from the soil; stalk pieces of 10–15 cm, including the node, were cleaned with a commercial detergent and washed with tap water. Subsequently, the stalk pieces were washed in sterile distilled water and immersed in 1% Chloramine T. After the rind was discarded in sterile conditions, the stem samples were treated as mentioned for roots. $500 \mu\text{L}$ aliquots from the roots or stem macerates were inoculated in 10 mL serum vials containing 5 ml of SA-LGI (90 replicates per root or 270 per stem of each cultivar). These cultures were incubated at 30°C for 5–7 days. Then such vials were replicated into SA-LGI and incubated at 30°C . After 5 days, the vials were assayed for acetylene reduction activity (ARA). Nitrogenase positive vials with thick yellow surface pellicle were streaked onto acetic LGI agar plates, incubated at 30°C . After 7 days dark orange colonies were picked into SA-LGI and incubated as mentioned above. Thereafter, vials with growth were streaked onto potato agar plates to check for purity, and transferred to acetic LGI (pH 6.5) agar slants for storage of cultures. Strains were considered to be different when they were isolated from different plants, according to the criteria of Cavalcante and Döbereiner (1988).

Identification of *Acetobacter diazotrophicus*

Isolates identification was based on characteristic biochemical tests, such as, N₂ fixation with and without NO₃, overoxidation of ethanol and glucose, NO₃-reduction, growth and N₂ fixation with 30% glucose or sucrose, growth and N₂ fixation at pH below 3.0, growth and acid production from different carbon sources (sucrose, galactose, fructose, glucose, maltose, mannose, arabinose, ethanol, i-inositol, mannitol and glycerol), and growth on organic acids (acetate, lactate, malate, fumarate and succinate), among other tests; colonial morphology in LGI and potato agar plates was considered also (Cavalcante and Döbereiner, 1988; Gillis et al., 1989). *A. diazotrophicus* strains PAI 5^T (Type strain, ATCC 49037), PPe 4 (ATCC 49038) and PR 2 (ATCC 49039), kindly provided by Dr J Döbereiner, were used as controls in all performed tests.

Acetylene reduction assay

Gas chromatograph and conditions to determine ARA were as we described previously (Mascarúa-Esparza et al., 1988).

Indole compounds assays

To determine indole compounds synthesis by isolates of *A. diazotrophicus*, an inoculum was prepared by growing the organisms (GYC broth) in shake culture (220 rpm) for 36 h at 30 °C and then the cultures were twice centrifuged and resuspended each time with 50 mM KH₂PO₄ (pH 6.0). The bacterial cultures were adjusted to 50 Klett units (green filter; 1 × 10⁸ UFC mL⁻¹). *A. diazotrophicus* strains (1.0 mL inoculum) were grown in 125 mL flasks containing 49 mL of medium in shake culture (200 rpm) for 24 h at 30 °C. Bacterial cultures were centrifuged (13,000 g for 15 min at 4 °C); the supernatant obtained was filtered through 0.45 μm pore size Millipore filter (Harari et al., 1988). Subsequently, the supernatants were adjusted with HCl to pH 2.7. Procedure for indoles extraction, treatment of the solvents and TLC plates were done according to Iino et al. (1980). Indole compounds were extracted three times with 30 mL

volumes of ethyl acetate, which was previously washed with water, passed through cotton wool and adding BHT (butylated hydroxytoluene), as antioxidant. The extracts were evaporated to dryness under vacuum with rotary evaporator at 37 °C, then the residue was dissolved in 1.0 mL of methanol. An aliquot of 50 μL in methanol was chromatographed on silica gel (HF₂₅₄, Merck) thin layer plates. The plate was developed using the solvent system benzene-ethyl acetate-acetic acid (70:25:5). Authentic indoles, indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-aldehyde (IAld), indole-3-lactic acid (ILA), indole-3-butyric acid (IBA), indole-3-propionic acid (IPA) and indole-3-pyruvic acid (IPyA) were chromatographed as referenced. The separated compounds were visualized by their fluorescence under ultraviolet (UV 254 nm) light and colour developed with Van Urk-Salkowski reagent (Ehmann, 1977). The spots corresponding to IAA were scraped from the silica gel plates. Solid support was suspended in methanol, centrifuged and aliquots analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC analysis was performed by ion-pair reversed-phase on a Waters Associates μBondapak C₁₈ Rad-Pak cartridge (10 cm × 8 mm i.d.) and a mobile phase of 27.5% methanol in 0.1 M KH₂PO₄ (pH 6.5) containing 10 mM tetrabutylammonium phosphate (Millipore, Corp.). Flow rate was 1.5 mL min⁻¹ and the operating pressure was 900 lb/in². Detection was at 280 nm (Waters 440 Absorbance detector, mercury lamp) and quantitation was made by area integration through the Waters Data Module microprocessor. Retention times for peaks were compared to that of authentic IAA standard.

Results and discussion

Several diazotrophic endophytic isolations from diverse sugarcane cultivars grown in various areas of México (Table 1), were properly identified as belonging to the species *Acetobacter diazotrophicus*, all the strains exhibited the same morphological, biochemical and physiological characteristics reported by Cavalcante and

Table 1. Isolation frequencies of *Acetobacter diazotrophicus* from different sugarcane cultivars sown in field

Location	Cultivar	Isolation (%)	
		Root	Stem
Atencingo, Puebla ¹	MEX 57-473	2.5	N.D.
Atencingo, Puebla ¹	CP 72-2086	2.1	N.D.
Atencingo, Puebla ¹	MY 55-14	N.D.	1.3
Atencingo, Puebla ¹	MEX 76-646	0.0	0.0
Yautepec, Morelos ¹	MEX 68-808	0.0	0.0
Yautepec, Morelos ¹	CP 29-203	0.0	0.0
Yautepec, Morelos ¹	Z MEX 55-32	0.0	1.7
Yautepec, Morelos ¹	MEX 69-749	N.D.	1.1
Córdoba, Veracruz ²	MEX 56-476	10.0	30.0
Córdoba, Veracruz ²	MEX 69-290	N.D.	17.0
Córdoba, Veracruz ²	MEX 73-523	55.0	67.0
Orizaba, Veracruz ²	MEX 79-546	65.0	N.D.
Orizaba, Veracruz ²	MEX 80-499	10.0	N.D.

¹ N fertilizer added to the cultivar: 275–300 kg ha⁻¹.

² N fertilizer added to the cultivar: 120 kg ha⁻¹.

N.D. Not determined.

Döbereiner (1988), and Gillis et al. (1989). Moreover, it is known that 16S ribosomal RNA (16S rRNA) molecule is universal and conserved in functions (Young, 1992). Comparisons between the 16S rRNA molecule of strains PR 2 (ATCC 49039) and UAP 5665 (isolated in this work) revealed that they belong to the same species (P. Young, pers. comm.).

Isolation frequencies from roots or inside stems ranged from 1.1% to 67% (Table 1). Interestingly, the lowest isolation frequencies (1.1 to 2.5%) were obtained from locations where the rate of nitrogen fertilization was the highest (275–300 kg ha⁻¹). In addition, we could not obtain isolates from some sugarcane varieties (CP 29 203, MEX 68 808 and MEX 76 646) that were sampled in those locations. In contrast, we successfully isolated *A. diazotrophicus* in high frequencies (10 to 67%) from all the cultivars sampled in places where N fertilization rate was 120 kg ha⁻¹ only. These results suggest that associations between nitrogen fixing bacteria and plants may be severely limited when nitrogen fertilizers are supplemented in excess. Oaks (1992) considers that interactions and associations, between microorganisms and their host plant, may be inhibited by high levels of added fertilizers, as occur with *Rhizobium* spp. and mycorrhizal fungi and their host. We do not discount other factors, such as varietal and environmental effects, that could be responsible

for the results mentioned above. Unfortunately, the same sugarcane variety was not found in the different sampled localities to support our hypothesis.

It is noteworthy that the isolation frequencies of *A. diazotrophicus* from different parts of the stem varied. The higher frequencies were found in the apical stem region as compared to basal or intermediate regions (data not shown). This preferential distribution of *A. diazotrophicus* also occurs with other bacterial species found in the inner sugarcane stems. *Azotobacter vinelandii* has been found only in the apex, while *Erwinia herbicola*, was found both in apical and intermediate stem regions (Ruschel and Vose, 1984). We think that preferential distribution of *A. diazotrophicus* and probably some other endophytic sugarcane bacteria could be regulated by the quantity and quality of soluble sugars prevailing in a particular region of the plant. Nevertheless, this speculation should be demonstrated.

Interestingly, all different tested strains of *A. diazotrophicus* were able to produce indoles in defined liquid medium supplemented with tryptophan, as visualized by thin layer chromatography (TLC) plates. TLC analysis of acidic ethyl acetate extracts from eighteen *A. diazotrophicus* cultures always showed an identical color, after spraying with Van Urk-Salkowski reagent, and R_fs corresponding to standard IAA (R_f 0.546),

IAId (0.416), ILA (Rf 0.178) and IPA (Rf 0.614). HPLC analysis of IAA spots scraped of TLC plate corresponded to the retention time (6.2 min) of authentic IAA.

It is well known that many microbes and plants convert tryptophan to IPyA, an intermediate of IAA biosynthesis in higher plants. Even though we do not detect IPyA, we found ILA, which is a product of reduction of IPyA (Sheldrake, 1973). This result suggests that the biosynthesis of IAA from tryptophan, by *A. diazotrophicus*, is via indole-3-pyruvic acid (Sandberg et al., 1987).

Production of IAA by 18 strains of *A. diazotrophicus* analyzed quantitatively by the colorimetric Salkowsky assay (Tang and Bonner, 1947), was as high as 19 to 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (data not shown). These IAA levels produced by *A. diazotrophicus* are similar to those reported for *Azospirillum brasilense* (Hartmann et al., 1983; Jain and Patriquin, 1985) using the Salkowsky reaction. However, it has been demonstrated (Crozier et al., 1988) that the Salkowsky assay is not a reliable method for measuring IAA.

On the other hand, estimates obtained from HPLC analyses revealed that four *A. diazotrophicus* strains produced IAA above 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 2), with the highest amount (2.42 $\mu\text{g mL}^{-1}$) found in the culture medium from PAI 5^T strain. The other six strains yielded lower amounts at rates of 0.14 to 0.77 $\mu\text{g IAA mL}^{-1}$. This bacterium produced similar

rates of IAA in culture medium, to those reported for the rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum* in quantitative estimates obtained by HPLC procedures (Crozier et al., 1988).

Taking into account that *A. diazotrophicus* is found within the plant tissue and is propagated via the planting material (stalk pieces), IAA production suggests that this bacterium could promote rooting and improve sugarcane growth by direct effects on metabolic processes, in addition to a role in N_2 fixation as suggested (Boddey et al., 1991; Cavalcante and Döbereiner, 1988).

Acknowledgements

We are grateful to J Döbereiner (EMBRAPA, Brazil) for valuable opinions on the isolation of *A. diazotrophicus*, during a visit in our laboratory, to J P W Young (University of York, U.K.) for 16S rDNA sequence data. We are also grateful to Esperanza Martínez (CIFN-UNAM, México) for stimulating discussion and comments of this manuscript, to Georgina Hernández (CIFN-UNAM) for correcting the English manuscript, to Ivonne Toledo (CIFN-UNAM) for HPLC analyses of indoles. We thank J Martínez A (Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar, I. de Matamoros, Puebla), to J Guzmán (Biotecnología y Derivados de Morelos) and to J M Minjarez C (Ingenio El Carmen, Córdoba, Veracruz) for their support in collecting sugarcane plants. This work was partially supported by grant D112-903772 from CONACYT (México), and by grant 90-01-0474 from DGICSA-SEP (México).

References

- Balandreau J 1983 Microbiology of the association. *Can. J. Microbiol.* 29, 851-859.
- Barea J M and Brown M E 1974 Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances. *J. Appl. Bacteriol.* 37, 583-593.
- Boddey R M, Urquiaga S, Reis V and Döbereiner J 1991 Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant and Soil* 137, 111-117.

Table 2. Indoleacetic acid production by different strains of *Acetobacter diazotrophicus*

Sugarcane cultivars	PIS*	Strain designation	IAA conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MEX 57-473	(Wr)	UAP 5701	1.07
MEX 73-523	(Ap)	UAP 7306	1.00
MEX 73-523	(Ap)	UAP 7308	1.12
CP 72-2086	(Wr)	UAP 7210	0.31
MEX 69-290	(In)	UAP 6925	0.77
Z MEX 55-32	(In)	UAP 5560	0.57
MEX 56-476	(Sr)	UAP 5665	0.22
(1)		PAI 5	2.42
(1)		Ppe 4	0.14
(1)		PR 2	0.49

* Plant isolation site: Surface-sterilized root (Sr); Washed root (Wr); Inside stem (Intermediate [In]; Apical [Ap]); stem region in relation to distance of soil.

(1) Gillis et al., 1989.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Brown M E 1972 Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *J. Appl. Bacteriol.* 35, 443-451.
- Cavalante V A and Döbereiner J 1988 A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108, 23-31.
- Clark A G 1974 Indole acetic acid production by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Microbios* 11A, 29-35.
- Crozier A, Arruda P, Jasmim J M, Monteiro A M and Sandberg G 1988 Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2833-2837.
- De Ley J, Swings J and Gosselé F 1984 Genus I. *Acetobacter beijerinckii* 1898, 215. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. N R Krieg and J G Holt, Vol I, pp 268-274. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Döbereiner J 1961 Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia Derx* in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil* 15, 211-216.
- Ehmann A 1977 The Van Urk-Salkowski reagent - a sensitive and specific chromatogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J. Chromatogr.* 132, 267-276.
- Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt M, Stephan M P, Teixeira K R S, Döbereiner J and De Ley J 1989 *Acetobacter diazotrophicus* sp nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 361-364.
- Harari A, Kigel J and Okon Y 1988 Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant and Soil* 110, 275-282.
- Hartmann A, Singh M and Klingmüller W 1983 Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29, 916-923.
- Iino M, Yu R S T and Carr D J 1980 Improved procedure for the estimation of nanogram quantities of indole-3-acetic acid in plant extracts using the Indolo- α -pyrone fluorescence method. *Plant Physiol.* 66, 1099-1105.
- Jain D K and Patriquin D G 1985 Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hair. *Can. J. Microbiol.* 31, 206-210.
- Li R P and Macrae I C 1991 Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 23, 999-1002.
- Libbert E and Risch H 1969 Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. V. Isolation and identification of the IAA-producing and -destroying bacteria from pea plants. *Physiol. Plant* 22, 51-58.
- Libbert E, Wichner S, Seltiewer U, Risch H and Kaiser W 1966 The influence of epiphytic bacteria on auxin metabolism. *Planta (Berl.)* 68, 327-334.
- Mascariá-Esparza M A, Villa-González R and Caballero-Mellado J 1988 Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil* 106, 91-95.
- Oaks A 1992 A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *BioScience* 42, 103-111.
- Patriquin D G, Döbereiner J and Jain D K 1983 Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29, 900-915.
- Prikryl Z, Vancura V and Wurst M 1985 Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. *Biol. Plantarum* 27, 159-163.
- Rennie R J, Freitas J R de, Ruschel A P and Vose P B 1982 Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Can. J. Microbiol.* 28, 462-467.
- Ruschel A P and Vose P B 1984 Biological nitrogen fixation in sugar cane. In *Current Developments in Biological Nitrogen Fixation*. Ed. N S Subba Rao, pp 219-235. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.
- Sandberg G, Crozier A and Ernsten A 1987 Indole-3-acetic acid and related compounds. In *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. Eds. L. Rivier and A. Crozier, pp 169-301. Academic Press Inc. London
- Sheldrake A R 1973 The production of hormones in higher plants. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 48, 509-559.
- Tang Y W and Bonner J 1947 The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* 13, 11-25.
- Tien T M, Gaskins M H and Hubbell D H 1979 Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016-1024.
- Young J P W 1992 Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *Biological Nitrogen Fixation*. Eds. G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans, pp 43-86. Chapman and Hall, New York.
- Zafar Y, Wahid A, Rasul E and Malik K A 1986 Root associated nitrogen fixation by sugar cane (*Saccharum officinarum* L. var. Col-54) in Pakistan. *Pak. J. Bot.* 18, 221-228.

Section editor: R O D Dixon