

UCH-FC
MAG-Microb
M 912
C. 1

**Especificidad de huésped y variabilidad genética de cepas de
Frankia aisladas de nódulos radiculares de las plantas de la
familia Rhamnaceae, detectada mediante análisis de
marcadores moleculares RAPDs y PCR-RFLP**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar el grado de
Magíster en Ciencias en Ciencias Biológicas con mención Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Gloria María Mosquera Cifuentes

Agosto, 2002

Director de tesis: Dra. Margarita Carú M.

2002



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

Gloria María Mosquera Cifuentes

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de agosto de 2002

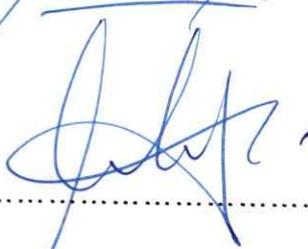
Director de Tesis:
Dra. Margarita Carú M



.....

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Victor Cifuentes



.....

Dr. Carlos Jerez



.....

A mis padres

A mi esposo

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Margarita Carú, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y también por su constante apoyo durante todo el programa de Magíster.

Al Dr. Victor Cifuentes por su apoyo y gestión en mi permanencia en el programa de Microbiología.

A FONDECYT, por el financiamiento a través del proyecto 1980752.

A mis compañeros de Laboratorio, Dony, Juanita, Mónica, Pilar, quienes me brindaron su apoyo durante las distintas fases de mi Magíster.

A Rafa por su gran amistad y también por permitirme compartir experiencias del trópico en el sur del continente.

A todos mis amigos chilenos Sandra, Ingrid, Bárbara, Pato, Rubén, Salvador por su amistad y apoyo cuando mas los necesité.

A mis padres chilenos, Sary y David por brindarme amor de hogar lejos de mi Colombia adorada y por sus voces de aliento en los momentos más difíciles de esta etapa de mi vida.

A Don Juan y Doña Margarita por su ternura y apoyo.

A mis jefes del CIAT, Joe Tohme y Valerie Verdier por el apoyo y colaboración durante el proceso de escritura de la tesis.

A mi compañera de trabajo del CIAT, Silvia por sus consejos y su ayuda en el procesamiento de algunos datos de la tesis.

A toda mi familia, a mis padres por heredarme la facultad de luchar para salir adelante por duro que parezca el camino. A mis hermanos por su constante apoyo a través de la distancia. A mis sobrinos por su amor y ternura.

A mi esposo Jaime, por su amor y paciencia para aguantar la separación sin dejar de ser un punto de apoyo importante a lo largo de mi estadía en Chile.

A Dios por sus bendiciones y compañía.

INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y METODOS	11
I. Materiales	11
1. Material biológico	11
1.1 Cepas	11
1.2 Enzimas	11
2. Reactivos químicos	13
II. Métodos	13
1. Cultivo de cepas	13
2. Extracción de DNA	14
3. Amplificación por PCR	15
3.1 Digestión con endonucleasas de restricción	16
2. Análisis de datos	17
3. Ensayos de inoculación cruzada	18
3.1 Preparación del inóculo	18
3.2 Condiciones de germinación y crecimiento de las plantas	18
3.3 Actividad nitrogenasa	20
RESULTADOS	22

	Página
I. Análisis de marcadores RAPDs	22
II. Análisis de marcadores PCR-RFLP	27
1. Región intergénica <i>nifD-nifK</i>	27
2. Región intergénica 16S-23S	34
III. Rango de huésped	41
1. Infectividad y efectividad de las cepas	41
2. Efecto de la nodulación inducida por <i>Frankia</i> sobre el crecimiento de las plantas	50
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	76
Apéndice 1.	77
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Esquema del proceso de inoculación de <i>Frankia</i> y medición de su efecto en los diferentes hospederos.	- 19
Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa de marcadores RAPD's obtenidos con el partidor AA06.	23
Fig. 3. Dendrograma obtenido mediante análisis de cluster UPGMA de los marcadores RAPD's utilizando el coeficiente de Jaccard.	26
Fig. 4. Localización de los partidores y producto de amplificación esperado para las regiones intergénicas entre los genes <i>nifD-nifK</i> y ribosomales 16S- 23S.	28
Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de digestión del amplificado de la región intergénica entre <i>nifD-nifK</i> con la enzima <i>Bst</i> UI.	29
Fig. 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con los productos de digestión del amplificado de la región intergénica entre <i>nifD-nifK</i> con la enzima <i>Msp</i> I.	30
Fig. 7. Dendrograma obtenido mediante análisis de cluster UPGMA de los marcadores PCR-RFLP de la región intergénica <i>nifD-nifK</i> utilizando el coeficiente de Jaccard.	35
Fig. 8. Electroforesis de gel de poliacrilamida con los productos de digestión del amplificado de la región intergénica entre 16S-23S con la enzima <i>Msp</i> I.	36
Fig. 9. Electroforesis de gel de poliacrilamida con los productos de digestión del amplificado de la región intergénica entre 16S-23S con la enzima <i>Hae</i> III.	37

Fig.10. Dendrograma obtenido mediante análisis de cluster UPGMA de los marcadores RFLP de la región intergénica 16S-23S utilizando la distancia de Jaccard.

40

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas de <i>Frankia</i> estudiadas, plantas hospederas y procedencia.	12
Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados en los marcadores RAPDS.	22
Tabla 3. Tamaño de los diferentes fragmentos amplificados mediante RAPD's, utilizando 3 partidores diferentes.	24
Tabla 4. Fragmentos de restricción obtenidos por digestión del producto amplificado de la región intergénica <i>nifD-nifK</i> con diferentes enzimas de restricción.	31
Tabla 5. Patrones RFLP obtenidos a partir de la región intergenica <i>nifD-nifK</i> de <i>Frankia</i> .	33
Tabla 6. Fragmentos de restricción obtenidos por digestión del producto amplificado de la región intergénica 16S-23S con diferentes enzimas de restricción.	38
Tabla 7. Patrones RFLP obtenidos a partir de la región intergenica 16S-23S de <i>Frankia</i> .	39
Tabla 8. Porcentaje de nodulación inducida por cepas de <i>Frankia</i> .	43
Tabla 9: Infectividad y efectividad de las cepas de <i>Frankia</i> en simbiosis con <i>Trevoa trinervis</i> .	45
Tabla 10. Infectividad y efectividad de las cepas de <i>Frankia</i> en simbiosis con <i>Elaeagnus angustifolia</i> .	46

	Página
Tabla 11. Infectividad y efectividad de las cepas de <i>Frankia</i> en simbiosis con <i>Casuarina cunninghamiana</i> .	48
Tabla 12. Infectividad y efectividad de las cepas de <i>Frankia</i> en simbiosis con <i>Alnus glutinosa</i> .	49
Tabla 13. Efecto de la inoculación con cepas de <i>Frankia</i> sobre el crecimiento de <i>Trevoa trinervis</i> .	52
Tabla 14. Efecto de la inoculación con cepas de <i>Frankia</i> sobre el crecimiento de <i>Elaeagnus angustifolia</i> .	53
Tabla 15. Efecto de la inoculación con <i>Frankia</i> sobre el crecimiento de <i>Alnus</i> <i>glutinosa</i> .	56
Tabla 16. Efecto de la inoculación con <i>Frankia</i> sobre el crecimiento de <i>Casuarina cunninghamiana</i> .	57

ABREVIATURAS

CETAB	N-Cetil-trimetil amonio bromuro
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
GC	contenido guanina citocina
IGS	espacedor intergénico
Kb	Kilobases
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	peso/volumen
RAPD	polimorfismo de DNA amplificado al azar
RFLP	polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	tris-acido acetico-EDTA
TE	tris-EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminoetano
U	unidades
v/v	volumen/volumen

RESUMEN

Frankia es un microsimbionte que induce la formación de nódulos radiculares en un gran número de plantas no leguminosas que habitan múltiples ambientes.

En Chile, *Frankia* está asociada a 5 géneros de plantas actinorrhizas de la familia Rhamnaceae: *Colletia*, *Trevoa*, *Talguenea*, *Discaria*, y *Retanilla*. Estudios previos en los que se ha utilizado cepas de esta familia de plantas reveló que estas cepas están estrechamente relacionadas, mostrando similitud tanto en sus caracteres fenotípicos como a nivel de secuencia del 16S rDNA. En este estudio se propone conocer acerca de la extensión de la diversidad genética del microsimbionte aislado de plantas de Rhamnaceas, y también determinar su rango de huésped. Para esto, las cepas se caracterizaron utilizando marcadores moleculares como RAPDs y PCR-RFLP de las regiones intergénicas entre los genes *nifD-nifK* y 16S-23S.

Para los marcadores RAPD se probaron un grupo de partidores de los cuales se seleccionaron aquellos que mostraron gran poder de discriminación con todas las cepas. Se obtuvieron 51 bandas las cuales se analizaron para su presencia y ausencia, y luego se calculó el coeficiente de similaridad entre las cepas. El dendrograma obtenido muestra bajos valores de similitud entre las cepas y se puede distinguir entre ellas de acuerdo a los patrones RAPD.

Además, todas las cepas se caracterizaron por marcadores RFLP utilizando diferentes enzimas de restricción. Las secuencias blanco para estos marcadores fueron fragmentos amplificados de dos regiones intergénicas entre los genes ribosomales 16S-23S, y entre los genes *nifD-nifK*. Este análisis se realizó utilizando 61 y 45 bandas respectivamente, el cual mostró una buena discriminación entre las cepas. Aunque algunas cepas comparten el mismo patrón de bandeo para muchas enzimas de restricción, cuando ellos son combinados los patrones son mas distintivos para cada una de las cepas. Estos marcadores moleculares establecen relaciones de similitud entre cepas derivadas de una familia de plantas como también de las que son aisladas de diferentes familias. El dendograma obtenido para la región 16S-23S agrupa todas las cepas aisladas de rhamnaceas en un cluster con un nodo por encima de 30% de similitud. Cuando se utiliza la región entre *nifD-nifK*, las cepas que provienen de rhamnaceas se agrupan con valores por encima de 40% de similitud. También puede verse que dos cepas, Tt11 y Tt42, aisladas de *Trevoa trinervis* comparten los mismos haplotipos para 4 de las enzimas utilizadas. Las cepas de otras familias generalmente caen fuera del cluster de la familia Rhamnaceae.

Las cepas de *Frankia* se probaron en plantas pertenecientes a 4 grupos de especificidad de huésped: *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae), *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae), *Alnus glutinosa* (Betulaceae), y *Casuarina cunninghamiana* (Casuarinaceae). Todas las cepas aisladas de la familia Rhamanceae fueron capaces de nodular *T. trinervis* y *E. angustifolia*. Solamente una de ellas, Ch14 aislada de *Colletia hystrix*, fue infectiva en *A. glutinosa*.

Estos resultados sugieren que las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamanceae pertenecen a la subdivisión de infectividad de *Elaeagnus* definido para el género *Frankia*.

Todos los nódulos inducidos por *Frankia* mostraron reducción de acetileno, indicando que el microsimbionte utilizado como inóculo fue efectivo en la fijación de nitrógeno.

El efecto de la simbiosis actinorrícica en las plantas utilizadas se determinó utilizando los siguientes parámetros: altura del tallo, peso seco total, diámetro del tallo, y contenido total de nitrógeno. Todas las cepas aisladas de rhamnaceas tuvieron un efecto positivo en las plantas hospederas de *T. trinervis* y *E. angustifolia*.

La identificación de los mejores pares simbióticos (Cepa-planta) es esencial para la evaluación de posibles usos de esta simbiosis en estrategias de recuperación de suelos.

ABSTRACT

Frankia is a nitrogen fixing microsymbiont that induces root nodules with a large number of non-leguminous plants that inhabit various environments.

In Chile, *Frankia* is associated with five genera of actinorhizal plants from Rhamnaceae family: *Colletia*, *Trevoa*, *Talguenea*, *Discaria*, and *Retanilla*. Previous studies using *Frankia* strains from these actinorhizal plants showed that these strains are closely related showing the same phenotypic features and 16S rDNA sequence. In this approach, it is proposed to know about genetic diversity extension of microsymbiont isolated from Rhamnaceae family plants and determine their host range. For that, strains were characterized using molecular markers like RAPDs and PCR-RFLP of intergenic regions between *nifD-nifK* and 16S-23S ribosomal genes.

For RAPD markers a set of primers were probed and three of them were selected based on their amplification power with all strains. Fifty one bands were obtained, which were analyzed for their presence or absence, and then similarity coefficients were calculated among strains. The dendrogram obtained showed low values of similarity among strains that can be distinguished from each other on the basis of RAPD marker profiles.

In addition, all strains were characterized through RFLP markers using different restriction enzymes. Target sequences for these markers were amplified fragments of

two intergenic regions between 16S and 23S ribosomal genes, and between *nifD-nifK* genes. This analysis was done on basis of sixty one and forty five restriction fragments respectively, and showed a good discrimination among strains. Although some strains share some banding pattern (haplotypes) to a restriction enzyme, when several of them are combined, fingerprinting becomes more distinctive for each strain. These molecular markers establish similarity relationships between strains derived from a plant family as well as strains isolated from different family plants. The dendrogram obtained from 16S-23S RFLP, group all strains derived from rhamnial plants in a cluster with a node up to 30% of similarity. When *nifD-nifK* RFLP is used, strains that come from Rhamnaceae family are grouped with values up to 40% of similarity. It also can be seen that two strains, TtI42 and TtI11, taken out from *Trevoa trinervis* share the same haplotypes in four of the enzymes assayed. Strains from other families fell down generally out of the Rhamnaceae cluster.

The *Frankia* strains were tested on host plants belonging to the four host specificity groups: *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae), *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae), *Alnus glutinosa* (Betulaceae), and *Casuarina cunninghamiana* (Casuarinaceae). All strains isolated from Rhamnaceae were able to nodulate *T. Trinervis* and *E. angustifolia*. Only one of them, ChI4 isolated from *Colletia hystrix*, was also infective on *A. glutinosa*.

These results suggest that *Frankia* strains from Rhamnaceae belong to the *Elaeagnus* infective subdivision defined to *Frankia* genus. All *Frankia*-induced nodules showed a positive acetylene reduction, indicating that the microsymbionts used as inoculants were effective in nitrogen fixation.

The effect of actinorhizal symbiosis on the tested plants was determined by following parameters: shoot height, total dry weight, stem diameter, and total nitrogen content. All strains isolated from Rhamnaceae had a positive effect on the host plants *T. trinervis* and *E. angustifolia*.

The identification of the best *Frankia*- Actinorhizal plant symbiotic pairs is essential to evaluate the potential use of this symbiosis for land reclamation strategies.

INTRODUCCIÓN

Frankia es una bacteria filamentosa gram positiva que se aisló por primera vez en 1978 (Callaham *et al.*, 1978) y pertenece al orden Actinomycetales familia Frankiaceae. Esta bacteria es de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de aproximadamente entre 15 – 24 h. Los criterios taxonómicos más importantes para establecer el status genérico de este actinomicete son su morfología filamentosa, capaz de diferenciar sus hifas a la formación de vesículas y esporangios dependiendo de la edad del cultivo y de las condiciones de crecimiento (Newcomb y Wood, 1987). Características comunes entre los actinomicetos aeróbicos son su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en vida libre y en simbiosis con plantas superiores, la pared celular tipo III que hace referencia al contenido de ácido diaminopimélico, alanina, ácido glutámico, ácido murámico y glucosamina (Benson y Silvester, 1993). *Frankia* también posee un alto contenido de G + C en el rango de 68-72% (Lechevalier, 1994; Normand *et al.*, 1996).

Las plantas noduladas por esta bacteria, conocidas como actinorrhizas, son en general especies pioneras que colonizan suelos pobres en nitrógeno (Dawson, 1990). Algunas de ellas son de gran valor en la restauración y protección de suelos erosionados y degradados (Midgley *et al.*, 1983; Dawson, 1986). Las plantas actinorrhizas se encuentran en diferentes hábitats y se distribuyen en 8 familias de angiospermas dicotiledóneas: Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Eleagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae y Datisceae (Benson y Silvester, 1993). La simbiosis actinorrhiza es más

más promiscua comparada con la simbiosis entre leguminosa-*Rhizobium* en la cual las plantas hospederas pertenecen a una sola gran familia (Pawłowski and Biseling, 1996).

La familia Rhamnaceae posee 7 géneros actinorrícosos (Silvester *et al.*, 1985; Benson y Silvester, 1993). De ellos sólo 5 se encuentran en Chile: *Trevoa*, *Retanilla*, *Colletia*, *Talguenea* y *Discaria*, distribuidos principalmente en la región semiárida de Chile central (Rundel y Neel, 1978; Silvester *et al.*, 1985). A partir de nódulos de plantas hospederas de la familia Rhamnaceae se han aislado y caracterizado varias cepas de *Frankia* (Carrasco *et al.*, 1992; Carú *et al.*, 1990; Carú, 1993).

Las señales moleculares de la simbiosis actinorríca involucradas en el reconocimiento planta-microorganismo, no se conocen ni a nivel de planta ni a nivel de la bacteria.

El proceso de infección ocurre por dos vías (Miller y Baker, 1986). Una es por infección del pelo radical de la planta, el cual se caracterizó por la ramificación y el curvamiento del pelo radical. El otro es mediante un proceso de penetración intercelular de la epidermis y el córtex de la raíz donde las células se dividen aceleradamente como respuesta a la invasión del microorganismo (Benson y Silvester, 1993; Berry y Sunell, 1990; van Ghelue *et al.*, 1997). El proceso de infección en las plantas de la familia Rhamnaceae se ha descrito que ocurre vía penetración intercelular (Liu y Berry, 1991).

En *Rhizobium* el proceso de nodulación está controlado por varios genes denominados *nod* (Dénarie y Debellé, 1996). Existen antecedentes que sugieren la presencia de homólogos de estos genes en *Frankia*. Así, un posible homólogo a *nodD* de *Rhizobium leguminosarum* fue descrito mediante análisis de complementación de mutantes de *Rhizobium* con DNA de *Frankia* (Chen *et al.* 1991). Sin embargo los resultados han sido

contradictorios, ya que ni la hibridación heteróloga ni la complementación de mutaciones *nod* de *Rhizobium* están plenamente demostradas en *Frankia* (Ceremonie *et al.*, 1998).

En relación a la estructura y organización de los genes relacionados con la fijación de nitrógeno, mediante hibridización heteróloga se ha logrado identificar y secuenciar los genes estructurales del sistema nitrogenasa de *Frankia*, *nifH* que codifica para la proteína Fe dinitrogenasa reductasa, y *nifD-nifK* que codifican para los dos subunidades de la proteína MoFe dinitrogenasa (Normand *et al.*, 1988; Hirsch *et al.*, 1995). En 1995 Harriot *et al.*, aislaron un fragmento *Bam*HI de 4.5Kb de la cepa FaCpII que mapea río abajo de los genes *nifHDK* e identificaron los genes *nifX*, *nifW*, *nifB* y *nifZ*. Posteriormente, en un intento de conocer la organización del cluster génico *nif* de *Frankia* se clonó y secuenció los genes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB*, *nifU* y parte de *nifS* de una cepa de *Frankia* de *Elaeagnus umbellata* (Kim y An, 1997) y se encontraron además 3 ORF continuos a *nifS* (Yoo *et al.*, 1999).

DIVERSIDAD DE LAS CEPAS DE *Frankia*

El polimorfismo genético y fenotípico del género *Frankia* ha sido estudiado mediante distintos enfoques en la medida de la disponibilidad de las cepas. Así tenemos: estudios fisiológicos (Ruan y Wang, 1991); resistencia a antibióticos (Carú, 1993; Schwencke, 1994); análisis de ácidos grasos (Mirza *et al.*, 1991); serotipificación (Baker *et al.*, 1981); capacidad de nodulación (Baker, 1987; Nazaret *et al.*, 1989); los

patrones de proteínas totales mediante SDS-PAGE (Benson y Hanna, 1983; Benson *et al.*, 1984) entre otros.

Un análisis isoenzimático que estudió el patrón de isoenzimas como esterasas, aminopeptidasas y deshidrogenasas en extractos celulares mostró diferencias entre cepas aisladas de plantas de diferentes géneros de una misma familia, *Casuarinaceae*, aunque fue difícil diferenciar entre cepas aisladas de un mismo género (Gardes *et al.*, 1987; Girgis y Schwenke, 1993). Asimismo, utilizando perfiles isoenzimáticos de celulasas se pudo discriminar cepas pertenecientes a diferentes grupos de infectividad (Igual *et al.*, 2001).

Los patrones de restricción de DNAs genómicos totales (An *et al.*, 1985; Beyazova y Lechevalier, 1992; Bloom *et al.*, 1989) también permiten identificar cepas y agruparlas de acuerdo al huésped original desde donde fueron aisladas.

Estos marcadores genéticos muestran un importante polimorfismo entre las cepas de *Frankia* aisladas de diferentes plantas actinorrhizas. Sin embargo no todos son lo suficientemente discriminantes cuando se trata de cepas muy relacionadas como ocurre con las cepas obtenidas desde plantas de una familia actinorrhiza.

Con el advenimiento de la técnica de PCR se han desarrollado marcadores moleculares como RAPDs que permiten acceder directamente al genoma (Williams *et al.*, 1990). Los marcadores RAPDs, han sido utilizados para evaluar el polimorfismo entre cepas bacterianas emparentadas, con la ventaja que estos marcadores no requieren información de las secuencias blancas del genoma del microorganismo en estudio (Lin *et al.*, 1996; Megnegneau *et al.*, 1993; Sellsted *et al.*, 1992). Los marcadores RAPDs están basados en el uso de partidores cortos generalmente de 10 mer de secuencia al azar. Cuando estos partidores hibridan con el DNA cromosómico en una dirección

apropiada y separados por unos cientos de pares de bases hacen que la DNA polimerasa produzca un fragmento de amplificación de un tamaño correspondiente a la distancia entre cada par de partidores. La separación de los productos de amplificación, por electroforesis, genera un patrón de bandas (DNA fingerprinting) el cual es útil para diferenciar individuos e identificar polimorfismo genético (Olive, 1999).

La caracterización del genoma de *Frankia*, mediante la hibridización de DNA genómico, digerido con enzimas de restricción, con sondas específicas también genera un patrón de bandas que revela polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción, denominados marcadores RFLP (Jamman *et al.*, 1992; Maggia *et al.*, 1992). El polimorfismo en los sitios de restricción se produce por sustituciones de bases o eventos de inserción/delección. Sin embargo, la detección de RFLP mediante Southern, es una técnica laboriosa y requiere tener información sobre las secuencias blanco. Alternativamente es posible usar marcadores del tipo PCR-RFLP para la tipificación de especies bacterianas (Haukka *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 1996; Poussier *et al.*, 1999; Rosado *et al.*, 1998; Lumini y Bosco, 1996; Lumini *et al.*, 1996; McEwan *et al.*, 1994; Murry *et al.*, 1997; Rouvier *et al.*, 1996). El método se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma y posterior digestión con enzimas de restricción del amplicón correspondiente (Olive, 1999). Para detectar polimorfismo entre cepas muy relacionadas se utilizan regiones variables como son las regiones intergénicas entre los genes *nif*, o la región entre rDNA 16S y 23S (Mirza *et al.*, 1994a; Ritchie y Myrold, 1999). Estas regiones intergénicas presentan una mayor variabilidad que los genes que las flanquean (Normand *et al.*, 1988), y permiten la tipificación a nivel de cepas. Se ha visto que la región intergénica *nifD-nifK* presenta mayor longitud y variabilidad

entre cepas que la región *nifH-nifD* (Jamman *et al.*, 1993; Lumini *et al.*, 1996; Nalin *et al.*, 1995). Para ello se han diseñado partidores que permiten amplificar la región entre los genes *nifD-nifK* en cepas de *Frankia* aisladas de *Casuarina* (Maggia *et al.*, 1992) y *Elaeagnus* (Lumini y Bosco, 1996). Mediante Análisis PCR-RFLP de la región intergénica *nifD-nifK*, se identificaron dos grupos de cepas pertenecientes a grupos de infectividad diferentes, Elaeagnaceae y Casuarinaceae (Jamman *et al.*, 1993).

Los genes ribosomales también han sido considerados como marcadores importantes en el estudio de diversidad y filogenia de las bacterias debido a que son bastante conservados, tienen amplia distribución, y no poseen transferencia horizontal interespecífica (Woese, 1987). Si bien estos genes son bastantes conservados, sus regiones IGS presentan suficiente variabilidad para permitir el estudio de la diversidad entre cepas bacterianas de un mismo género como *Frankia*. Análisis mediante PCR-RFLP de la región IGS entre los genes que codifican para el RNA ribosomal 16S y 23S permitió identificar cepas de *Frankia* y asignar ciertos patrones a las especies genómicas ya descritas (McEwan *et al.*, 1994).

El análisis de secuencias de rDNA 16S también se usa para la caracterización molecular y en el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies genómicas de *Frankia* (Benson *et al.*, 1996; Mirza *et al.*, 1994b; Nazaret *et al.*, 1991), pero su poder de discriminación a nivel de cepas es bajo. Estudios realizados con cepas que infectan las familias Elaeagnaceae y Rhamnaceae demuestran que la diversidad entre ellas es muy baja, a pesar que se analizaron cultivos puros y muestras obtenidas a partir de nódulos, para evitar la selección producida por el aislamiento (Clawson *et al.*, 1998).

INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS DE *Frankia*

La evaluación de la simbiosis entre *Frankia* y su planta hospedera ha sido definida en base a dos parámetros: la infectividad y la efectividad. La infectividad hace referencia a la capacidad que posee determinada cepa para inducir la formación de nódulos en una planta hospedera determinada. Esta propiedad simbiótica se ha utilizado para definir los grupos de infectividad o rango de huésped de las cepas de *Frankia*. Por otro lado, la efectividad indica la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno en simbiosis y su efecto sobre el desarrollo de la planta hospedera.

Mediante ensayos de inoculación cruzada, utilizando especies vegetales de las distintas familias actinorrícicas, se han definido tres grupos de especificidad de huésped (HSG) en *Frankia*. En el Grupo 1: se encuentran las cepas que nodulan plantas de la familias Betulaceae y Myricaceae; en el Grupo 2 aquellas que nodulan la familia Casuarinaceae y en el Grupo 3 se incluyen las cepas que infectan plantas de la familia Elaeagnaceae (Baker, 1987). Hasta ahora se ha establecido la especificidad de algunas cepas de *Frankia* debido a la falta de cultivos puros aislados desde las diferentes familias de plantas actinorrícicas, como por ejemplo Rhamnaceae.

En la actualidad en el laboratorio se cuenta con un grupo de cepas de *Frankia* aisladas desde nódulos radiculares de plantas de la familia Rhamanceae las cuales han sido bien caracterizadas dentro del género *Frankia* mediante análisis morfo-fisiológicos (Carú, 1993; Carú, 1995), y estudios filogenéticos (Clawson *et al.*, 1998). Por lo tanto es posible ampliar el estudio del rango de hospedero de este grupo de microsimbiontes.

Antecedentes bibliográficos sugieren que este grupo de cepas podría pertenecer al grupo de infectividad 3 en base a que cepas aisladas de las Rhamnáceas *Colletia*

spinossisima (Gauthier *et al.*, 1984) y *Colletia cruciata* (Baker, 1987), fueron capaces de nodular dos especies vegetales de los géneros *Hippophae* y *Elaeagnus* (Elaeagnaceae).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que las cepas de *Frankia* aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae son infectivas no sólo sobre la planta huésped original de la cual fueron aisladas sino también fueron capaces de nodular otros géneros actinorrícicos de esta familia (Carú y Cabello, 1999). Asimismo, estudios recientes revelan que ellas también son infectivas en plantas de *Elaeagnus angustifolia*, Elaeagnaceae (Bravo, 2002).

Otros antecedentes que sugieren sobre la especificidad de huésped de *Frankia* son el análisis filogenético molecular de la bacteria con base en el rDNA 16S, y de las plantas hospederas en base al análisis de secuencia del gen *rbcL* (subunidad grande de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/ oxigenasa) del cloroplasto (Swensen y Mullin, 1997). La comparación de ambas filogenias revela que el agrupamiento de las cepas de *Frankia* es similar al de sus plantas hospederas sugiriendo una co-evolución en la asociación simbiótica (Simonet *et al.*, 1999). El árbol filogenético de las bacterias y de sus plantas hospederas revela la presencia de un cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae (Clawson *et al.*, 1998), sugiriendo la extensión de rango de huésped al menos a esta familia actinorrícica.

Estudios sobre la evolución de la simbiosis actinorrícicas ha permitido definir tres clados de cepas infectivas con diferentes grupos de plantas actinorrícicas identificadas por el análisis del gen *rbcL*. Aunque la evidencia claramente sugiere que las cepas de *Frankia* que infectan Rhamnaceae y Elaeagnaceae forman un clado, algunas

de estas cepas podrían tener preferencias de hospedero más amplia (Benson and Clawson, 2000).

El presente estudio comprende un grupo de cepas de *Frankia* estrechamente relacionadas obtenidas de diferentes géneros de la familia Rhamnaceae cuyo rango de huésped y variabilidad genética se desconoce. Tenemos así 14 cepas aisladas de *Colletia hystrix*, *Discaria trinervis*, *Discaria serratifolia*, *Talguenea quinquinervis*, *Trevoa trinervis*, y *Retanilla ephedra*. También fueron incluidas dentro del estudio cepas de referencia aisladas de la familia Casuarinaceae, Betulaceae (Carú *et al.*, 2000), y Elaeagnaceae.

HIPOTESIS

- 1) El poder de resolución de los marcadores moleculares RAPDs y PCR-RFLP permitiría detectar la diversidad genética de cepas de *Frankia* aisladas de una familia de plantas actinorrícicas (intrafamiliar) y establecer las relaciones de similitud genética de este grupo de cepas con aquellas derivadas de otras familias.
- 2) Dado que las cepas de *Frankia* aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae se encuentran relacionadas filogenéticamente con cepas de otras familias actinorrícicas, su rango de huésped puede ser más amplio e incluir otras plantas hospederas pertenecientes a otras familias actinorrícicas.

OBJETIVOS

Objetivo 1.

Determinar el polimorfismo genético de las cepas de *Frankia* mediante marcadores RAPDs utilizando partidores arbitrarios y PCR-RFLP de las regiones intergénicas entre los genes *nifD* y *nifK*, y de la región intergénica entre 16S y 23S rDNA.

Objetivo 2.

Determinar el rango de huésped del grupo de cepas mediante ensayos de inoculación cruzada y evaluar si la simbiosis es efectiva.

Para llevar a cabo este objetivo, cada cepa se utilizará como inóculo para infectar plantas hospederas representantes de cada grupo de infectividad y una planta huésped de la familia Rhamnaceae.

Grupo 1: *Alnus glutinosa* (Betulaceae)

Grupo 2: *Casuarina cunninghamiana* (Casuarinaceae)

Grupo 3: *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae)

Grupo 4: *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae).

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

1.- Material biológico

1.1 Cepas

Las cepas utilizadas, la planta hospedero y la localidad de origen son listadas en la Tabla 1. Las cepas de *Frankia*, obtenidas de la familia *Rhamnaceae*, y las cepas AacI, AacII, AacIII de la familia *Betulaceae* se aislaron en el laboratorio de Genética Bacteriana de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile partir de nódulos radiculares de plantas actinorrícicas (Carí, 1993, Carí *et al.*, 2000). Las cepas BR, Allo2, ArI3, Eu1b fueron proporcionadas por el Dr. Jaime Schwencke (CNRS, Francia).

1.2 Enzimas

La enzima RNAsa, se adquirió de Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA.

Taq Polimerasa, *HaeIII*, *MspI*, *CfoI*, se obtuvieron de GibcoBRL.

BstUI y *HhaI* se obtuvieron de New England BioLabs.

Tabla 1. Cepas de *Frankia* estudiadas, plantas hospederas y procedencia.

<u>CEPA</u>	<u>HOSPEDERA</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
Familia RHAMNACEAE		
Ch11	<i>Colletia hystrix</i>	Caleu, Chile
Ch12	<i>Colletia hystrix</i>	Caleu, Chile
Ch13	<i>Colletia hystrix</i>	El Romeral, Chile
Ch14	<i>Colletia hystrix</i>	El Romeral, Chile
Ch17	<i>Colletia hystrix</i>	Caleu, Chile
Dt11	<i>Discaria trinervis</i>	Bariloche, Argentina
Dt12	<i>Discaria trinervis</i>	Bariloche, Argentina
Ds112	<i>Discaria serratifolia</i>	Concepción, Chile
Re16	<i>Retanilla ephedra</i>	Cuesta la Dormida, Chile
Re17	<i>Retanilla ephedra</i>	Cuesta la Dormida, Chile
Tq15	<i>Talguenea quinquinervis</i>	Río Clarillo, Chile
Tq20	<i>Talguenea quinquinervis</i>	Río Clarillo, Chile
Tt111	<i>Trevoa trinervis</i>	Cajón del Maipo, Chile
Tt142	<i>Trevoa trinervis</i>	Caleu, Chile
Familia BETULACEAE		
AacI	<i>Alnus acuminata</i>	Tucumán, Argentina
AacII	<i>Alnus acuminata</i>	Tucumán, Argentina
AacIII	<i>Alnus acuminata</i>	Tucumán, Argentina
Ar13	<i>Alnus rubra</i>	Oregon, USA
Familia CASUARINACEAE		
BR	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Brasil
Allo2	<i>Allocasuarina verticillata</i>	Uruguay
Familia ELAEAGNACEAE		
Eu1b	<i>Elaeagnus umbellata</i>	Illinois, USA

2. Reactivos químicos

Los siguientes reactivos se adquirieron como se indica:

A Merck Química Chilena Soc. Ltda.: Acetato de potasio, acetato de sodio, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido bórico, alcohol isoamílico, cloroformo, cloruro de amonio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, CETAB, etanol absoluto, fenol, fosfato de potasio monobásico y dibásico, glucosa, molibdato de sodio, piruvato de sodio, propionato de sodio, rivo flavina, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de magnesio, sulfato de zinc,

A Gibco BRL: Agarosa, Tris, dNTPs los partidores FGPL 2054, FD1, FGPD 685-85, FGPK 333-35.

A Operon Technologies: partidores de la serie AA y AE.

A BioRad: EDTA, SDS.

A Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA: ácido nicotínico, biotina, bromuro de etidio, acrilamida y bis acrilamida

II. METODOS

1. Cultivo de las cepas

Las cepas de *Frankia* de Rhamnaceae se crecieron rutinariamente a 28°C sin agitación en medio líquido BAP suplementado con 1% glucosa y 5mM NH₄Cl como únicas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente.

Las cepas derivadas de otras familias actinorrhizas utilizan diferentes fuentes de carbono como sigue: cepas BR, AacIII, Allo2, Eu1b piruvato 10mM; cepas AacII, AacI, propionato 5mM.

El medio de cultivo BAP es una modificación de aquel descrito por Murry *et al.*, (1984) y contiene en, (g/l) glucosa, 10; MgSO₄ 7H₂O, 0,05; CaCl₂ 2H₂O, 0,01; FeEDTA, 0,01; NH₄Cl, 0,267; 1 ml de una solución de micronutrientes (Apéndice 1) 1 ml de una solución de vitaminas (Apéndice 1). Luego de esterilizar se le agregó 10ml de tampón fosfato estéril (10mM). El tampón fosfato se preparó titulando 1M K₂HPO₄ con 1M KH₂PO₄ hasta obtener un pH 6.8.

2. Extracción de DNA

El DNA total de *Frankia* se extrajo utilizando el método de Lumini *et al.*, (1996) modificado. El micelio se colectó en tubos de polipropileno de 15ml. El pellet se lavó con 5ml de H₂O estéril y luego se repitió el procedimiento utilizando 5 ml de TE100 (Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0). El micelio se resuspendió en 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM pH 9.5, NaCl 1.4 M, y CTAB 2% (w/v)) y macerado utilizando homogenizadores estériles. El homogenizado se incubó a 65°C por 1h. Posteriormente el debris celular se separó mediante centrifugación a 7.000 rpm por 10 min. El sobrenadante recuperado se colocó en un nuevo tubo y se mezcló con 1 volumen de una solución cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. El DNA se precipitó con un

volumen de isopropanol y 1/10 de acetato de sodio 3 M a -20°C por 1h, luego se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 70%, y se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en TE10 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) y tratado con 1 μl de RNAsa A 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 37°C por 1 h.

3. Amplificación por PCR

Diferentes regiones del genoma se amplificaron al azar, mediante la utilización de partidores de 10 nucleótidos que se obtuvieron de Operon (Operon Technologies, Alameda, CA). Se amplificaron concentraciones de DNA de entre 50 y 100 ng en un volumen final de reacción de 25 μl , conteniendo 3 mM de MgCl_2 , 0,4 mg de BSA, 0,4 μM de partidador, 0,1 mM de dNTPs, y 1,5 U de Taq polimerasa en tampón PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.8). Los tubos se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer), y se sometieron al siguiente programa de amplificación: Un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (1min a 94°C), apareamiento (1 min a 38°C), extensión (1min a 72°C), seguidos de una etapa de extensión final a 72°C por 5 min. Para la amplificación con el partidador AA06 el número de ciclos se redujo a 35 y la temperatura de apareamiento se aumentó a 40°C . Los amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.2% (p/v) en buffer TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato, 0.001 M EDTA pH 8.0) y se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Para amplificar las regiones IGS entre *nifD-nifK*, se utilizaron los partidores FGPD685-85 5' CACTGCTACCGGTCGATGAA (Jamman *et al.*, 1993) y FGPK333'-355 5'CCGGGCGAAGTGGCT (Nalin *et al.*, 1995). Para la amplificación de la región intergénica del rDNA 16S y 23S se utilizaron los partidores FDI 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (Weisburg *et al.*, 1991) y FGPL2054 5' CCGGGTTTCCCCATTCGG (Maggia *et al.*, 1992). 50-100 ng de DNA de *Frankia* se amplificaron en 25 µl de reacción final, que contenía 0,120 µM de cada partidor, 125 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1mg de BSA, y 1U de Taq polimerasa en tampón PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.8) La amplificación del DNA se realizó con el siguiente programa: una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C; 35 ciclos de desnaturalización (3 min a 94°C), apareamiento (1 min a 61°C), y extensión (1min a 72°C); y una etapa de extensión final de 3 min a 72°C. 10 µl del producto de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA pH 8.0) y se tiñó con bromuro de etidio 0.5µg/ml.

4. Digestión con Endonucleasas de restricción

El análisis de restricción de los productos de PCR de la región IGS *nifD-nifK* se realizó utilizando las enzimas *HaeIII*, *HhaI*, *BstUI*, y *MspI*. La región IGS de 16S-23S se digirió con *CfoI*, *HaeIII*, *BstUI*, y *MspI*. La digestión se realizó en 15 µl de reacción final, utilizando 10 µl de amplificado, 1,5 µl de buffer de reacción de cada enzima y 10 U de cada enzima. El volumen se ajustó

con agua destilada estéril. La mezcla se incubó a 37° C por 3 h. El producto de restricción se analizó por electroforesis en geles de Acrilamida-Bisacrilamida 8%, en buffer TBE (0.09 M Tris-Borato, 0.002 M EDTA pH8.0) a 100-120 volts por 6 h. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5µg/ml) por 5 min.

5. Análisis de Datos

La lectura de las bandas sobre los geles de agarosa para los marcadores RAPDs fue hecha manualmente, y para los marcadores RFLP se hizo mediante el programa ONE-Dscan versión 1.0 (Copyright{C} 1994 1995 Scanalytics, CSP Inc.).

Todos los fragmentos obtenidos se ordenaron de acuerdo a su peso molecular tomando como primera banda el fragmento de mayor tamaño. Cada cepa se evaluó para la ausencia (0) o presencia (1) de cada fragmento, obteniéndose una matriz binaria de 0 y 1, la cual se analizó por el programa NTSYS-PC (versión 2.0: Rohlf, 1994) para obtener una matriz de similitud para todos los pares posibles utilizando el coeficiente de Jaccard. Para el análisis de cluster de la matriz de similitud se utilizó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Mean Method)).

6. Ensayos de inoculación cruzada

Los estudios de infectividad para cada cepa se realizaron mediante la inoculación de 20 individuos de cada especie vegetal (*Trevoa trinervis*, *Casuarina cumingiana*, *Alnus glutinosa* y *Elaeagnus angustifolia*) (fig. 1).

6.1. Preparación del inóculo.

Las cepas utilizadas en la inoculación se mantuvieron en medio BAP-líquido sin nitrógeno. Para mantener el cultivo en fase exponencial se hicieron trasposos cada 6 días a un medio fresco, homogeneizando el micelio. Las células se colectaron por centrifugación a 5.000 rpm, se lavaron, y resuspendieron en una solución de Hoagland 1/4x pH 7.5 sin nitrógeno (Hoagland y Arnon, 1950), (apéndice 1) a una concentración final equivalente a 3 µg/ml de proteínas totales. La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (BioRad) utilizando una suspensión de micelio sonicado.

6.2. Condiciones de germinación y crecimiento de las plantas.

Las semillas de *T. trinervis* se colectaron en los alrededores de Santiago. Las de *C. equisetifolia*, *A. glutinosa* y *E. angustifolia* se obtuvieron en el Departamento de Silvicultura de la Universidad de Chile. Estas se esterilizaron y germinaron en arena estéril húmeda. Las plántulas de 4 a 5 cm de altura se repicaron individualmente en bandejas de poliestireno con una mezcla de turba:vermiculita (1:1) estéril y se fertilizaron semanalmente con 1ml

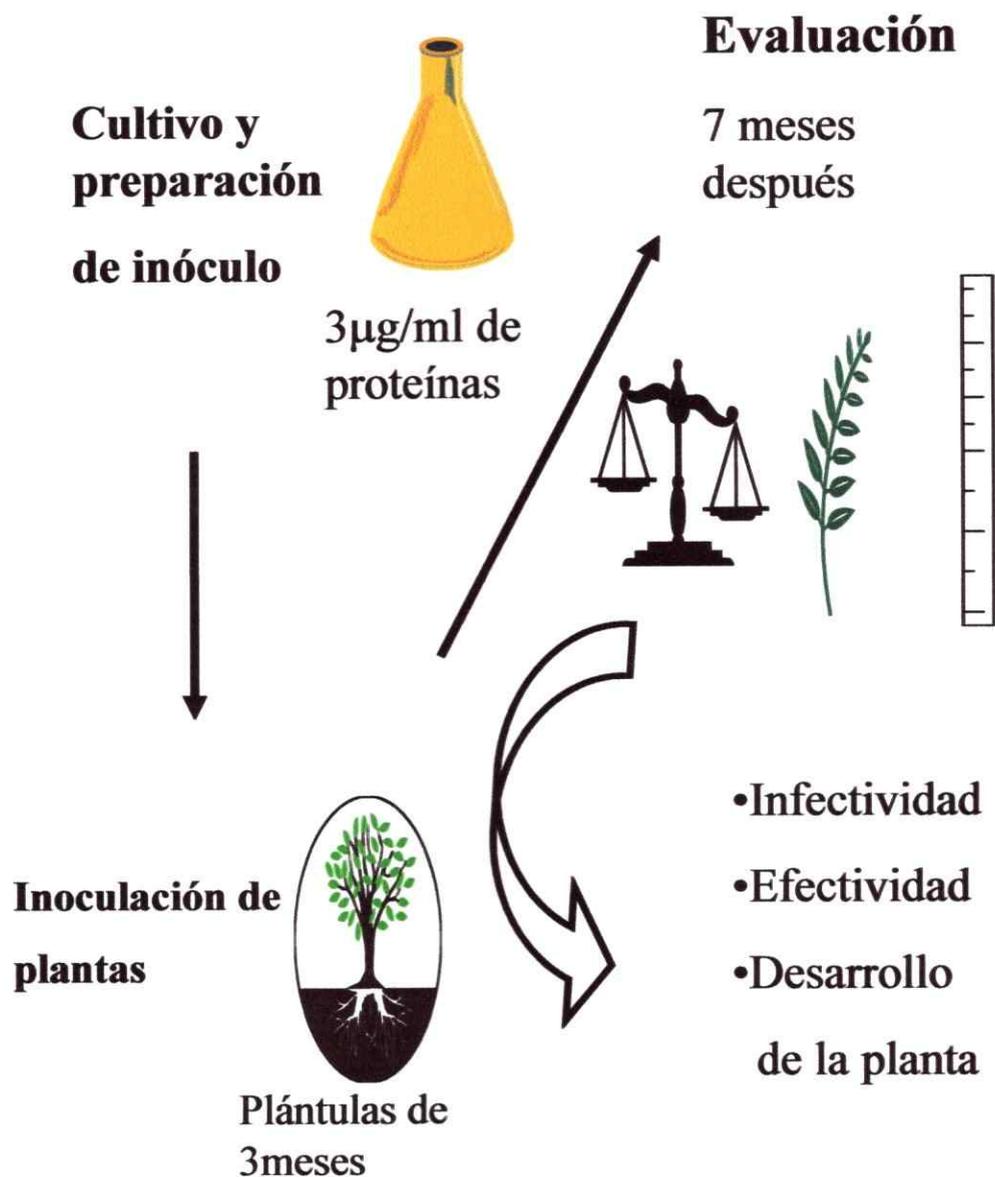


Fig. 1

Esquema del proceso de inoculación de *Frankia* y medición de su efecto en los diferentes hospederos.

de solución de Hoagland completo ($\frac{1}{4}x$), hasta que las plántulas alcanzaron los 3 meses de edad. Tres semanas antes de la inoculación se reemplazó la solución de Hoagland completo por Hoagland sin nitrógeno ($\frac{1}{4}x$). Cada planta se inoculó con 5 ml del inóculo bacteriano equivalente a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totales. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero por 7 meses con aplicaciones semanales de 1 ml de solución Hoagland sin nitrógeno ($\frac{1}{4}x$). Como control se utilizaron plantas crecidas en las mismas condiciones pero sin inóculo.

Los parámetros simbióticos de las cepas de *Frankia* se determinaron sobre 15 plantas de cada grupo y fueron los siguientes: número de plantas noduladas, número de nódulos por planta y, reducción de acetileno (actividad de nitrogenasa). El efecto de la nodulación sobre el crecimiento de las plantas se evaluó mediante biomasa total, altura del tallo y diámetro a nivel del cuello. 5 plantas de cada grupo se utilizaron para determinar el contenido de nitrógeno total mediante el método de Kjeldahl.

6.3.- Actividad nitrogenasa

Todos los nódulos fueron desprendidos de los sistemas radiculares de cada planta. Inmediatamente se expusieron a una mezcla de acetileno - aire al 10% v/v, y se colocaron en viales sellados e incubaron a 28°C por 3. La producción de etileno en cada vial se cuantificó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-8A siguiendo el método de Postgate (1972). El cromatógrafo

estaba equipado con un detector de hidrógeno de ionización por llama (FID) y una columna de acero inoxidable (1.0 m X 3mm) con Poropack N operada a 50°C y utilizando como carrier gas N₂ con un flujo de 2 ml/min. El inyector y detector de temperatura se operó a 100°C. La actividad específica de nitrogenasa *in planta* fue expresada como nmol de C₂H₄ producido/h/mg de peso seco de los nódulos.

RESULTADOS

1. Análisis de marcadores RAPD's

El DNA genómico de *Frankia* se amplificó por PCR utilizando partidores arbitrarios. Se probó un total de 20 partidores correspondientes a las series AA, AB, AE y AD de Operon Technologies. Se escogieron 3 partidores los cuales dieron patrones de amplificación para la mayoría de las cepas estudiadas (tabla 2).

Tabla 2: Secuencia de los partidores utilizados en los marcadores RAPDS

Partidor	Secuencia
AA06	5'GTGGGTGCCA3'
AA18	5'TGAGGCGTGT3'
AE01	5'TGAGGGCCGT3'

Cada partidor se trabajó con un ciclo térmico de amplificación distinto para obtener un patrón de bandas reproducibile y un número de bandas fácil de analizar. En la Fig. 2 se muestra a modo de ejemplo el patrón de bandas obtenido para el partidor AA06 con algunas cepas estudiadas. Con los tres partidores utilizados se observó un importante polimorfismo entre los patrones electroforéticos.

En la tabla 3 se muestra el tamaño de las bandas obtenidas para cada cepa. Los fragmentos amplificados varían entre 1500 y 230 bp. Se observa

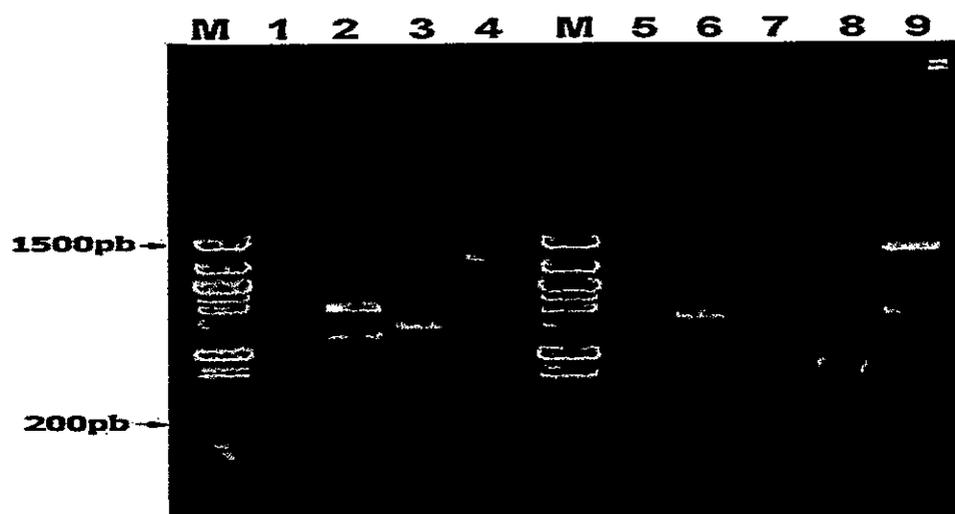


Fig. 2

Marcadores RAPD's obtenidos de DNA genómico de *Frankia* utilizando el partidor AA06.

Gel de agarosa 1% en buffer TAE teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. M, marcador de peso molecular 100bp. Líneas 1) ChiI, 2) Chi7, 3) Chi2, 4) Chi4, 5) AacI, 6) AacII, 7) AacIII, 8) BR, 9) EuIb.

Tabla 3. Tamaño (pb) de los diferentes fragmentos amplificados mediante RAPD's, utilizando 3 partidores diferentes.

Cepa	Partidores		
	AA06	AA18	AE01
ChI1	400-230	1400-800-600	1000-800-650-450-350
ChI2	1400-1200-650-450-350	650-1000-1200	1100-900-700-450
ChI3	1200-1000-600	650-750	1100-900-700-450
ChI4	1400-1200-800-650-500	1100-800	1000-850
ChI7	850-650	1500-1000-850-750-650-500-350	800-600
DsII2	n.d.	450-700-750	1000-900
DtI 1	1200-650-600	n.d.	1500-1000
Dt I2	n.d.	1100-900-750	1000-700-350
ReI6	900	650-1200	1500-1100-800
ReI 7	900	1250-550	1100-800-700
Tq 15	800-700-600	550-500-1200-1500	550-250
Tq 20	800-700-600	1500-350	1500-1100-900-800-600
TtI 11	900-700	550-650-350	1500-850-700-250
TtI 42	1200-800	1250-750-450	1500-1000-800
AacI	1400-800-650-450-230	1500-1350-900	1200-1100-800-700
AacII	1400-800-600-230	1500-700-850	500
AacIII	1400-800-700-650-500-400-230	1000-750-650-350	1000-700-450
ArI3	1100-1000	500-100-350	1500-1000-800
BR	650-500-450-350-230	750-550	850-700-600-500-450
Allo 2	650-500-450-400	700-900-1500	700-600
Eulb	1500-900-800-650-500-400	1100-500	1100-900-800-600

que algunas bandas obtenidas con los diferentes partidores son compartidas por varias cepas por ejemplo las bandas de 1400, 800 y 650 amplificadas con el partidador AA06.

Para el análisis de los datos, las bandas se identificaron de acuerdo a su tamaño y partidador utilizado, dando un patrón de bandas que caracterizó a cada cepa. La comparación entre ellas se realizó utilizando una matriz binaria que indicaba presencia (1) o ausencia (0) de la banda. La matriz obtenida se sometió a un análisis de cluster UPGMA y se obtuvo el dendrograma que se muestra en la Fig. 3.

El dendrograma obtenido muestra las relaciones de similitud entre las cepas estudiadas. La topología del dendrograma indica que existe bastante polimorfismo entre las cepas y valida el uso de estos marcadores para diferenciar cepas estrechamente relacionadas. Las relaciones de similitud entre las cepas son menores del 50% y por lo tanto en su conjunto las 21 cepas pueden identificarse porque exhiben una combinación de bandas distintivas. El número de marcadores RAPD (bandas amplificadas) es lo suficientemente alto y polimórfico como para discriminar el conjunto de cepas de *Frankia*. Los agrupamientos obtenidos no muestran ninguna asociación con el origen geográfico de las cepas o la planta huésped desde la cual fueron aisladas.

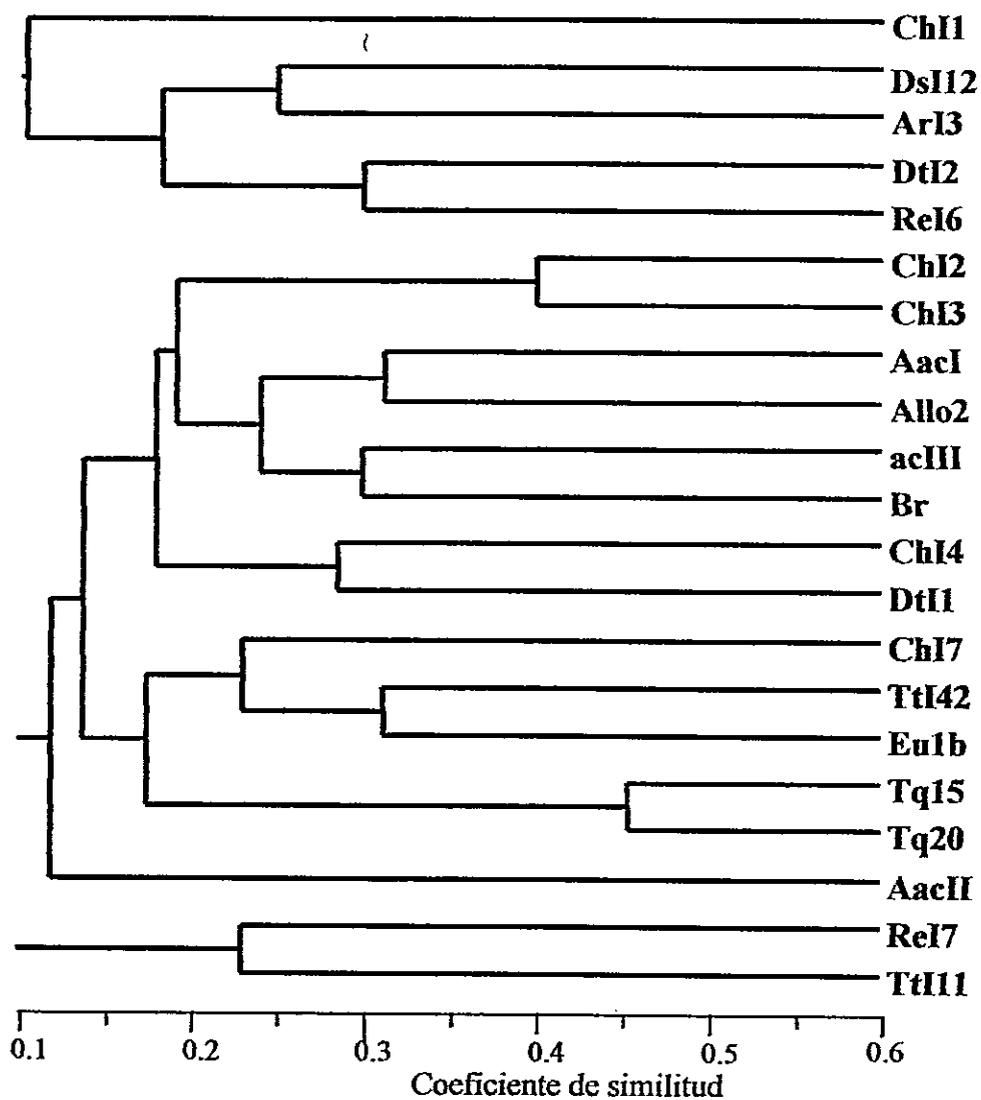


Fig. 3

Dendrograma mediante análisis de cluster UPGMA de los marcadores RAPDs utilizando el coeficiente de Jaccard.

2. Análisis de marcadores PCR-RFLP

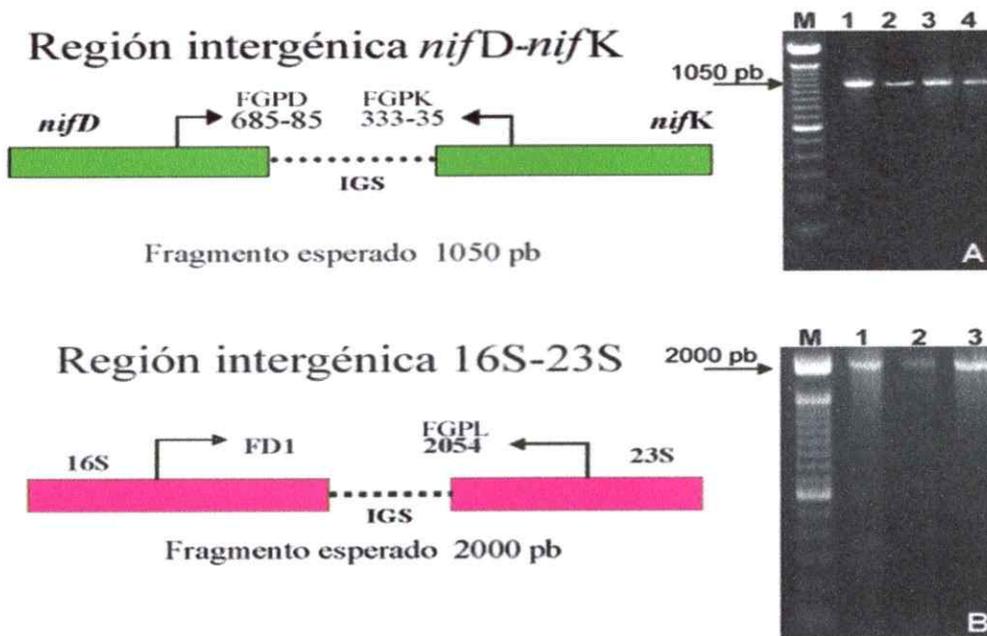
Los marcadores RFLP se obtuvieron por amplificación de dos regiones intergénicas i) la región entre los genes *nifD-nifK* y ii) la región ribosomal 16S-23S. Los amplificados obtenidos y los partidores se muestran en la Figura 4. Se obtuvo un fragmento de 1050 pb para la región *nifD-nifK* y de 2000 pb para la región IGS ribosomal 16S-23S. Ambos fragmentos se trataron con endonucleasas de restricción de corte frecuente que reconocen secuencias de 4 bp que contienen las bases GC para obtener los marcadores RFLP.

2.1. Region intergénica *nifD-nifK*

En las figuras 5 y 6 se muestran los patrones electroforéticos de los marcadores RFLP para la región *nifD-nifK* generados por las enzimas *Bst*UI y *Msp*I respectivamente.

Las Cepas aisladas de la familia Elaeagnaceae tales como Eulb y de la familia Betulaceae correspondiente a las cepas AacI, AacII, AacIII no se amplificaron por la pareja de partidores utilizados para esta región intergénica. Con la cepa ArI3 se obtuvo un amplificado muy tenue que posteriormente impedía la visualización de patrones de restricción claros y por este motivo se excluyó también del análisis PCR-RFLP.

Los fragmentos de restricción para la región IGS *nifD-nifK*, obtenidos para cada cepa con las distintas enzimas se indican en la Tabla 4. El rango de los fragmentos para esta región varió entre 360 y 80 pb. Los datos muestran que

**Fig. 4**

Localización de los partidores y productos de amplificación esperados para las regiones intergénicas entre los genes *nifD-nifK* y ribosomales 16S- 23S.

Los rectángulos representan los diferentes genes, las líneas punteadas representan las regiones intergénicas. El nombre de cada partidor y su lugar de apareamiento también se indica por las flechas. A la derecha se muestra la electroforesis en geles de agarosa 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$). A: Amplificación por PCR con los partidores FGPD685-85 y FGPK333-33 1) Allo2; 2) AacIII; 3) TtI11 y 4) Ds12; B: Amplificación por PCR con los partidores FGPL2054 y FD1 1) ChI3; 2), Rel6; 3) TtI11. M. marcador de peso molecular 100 bp. Las flechas indican el producto de amplificación esperado en cada caso.

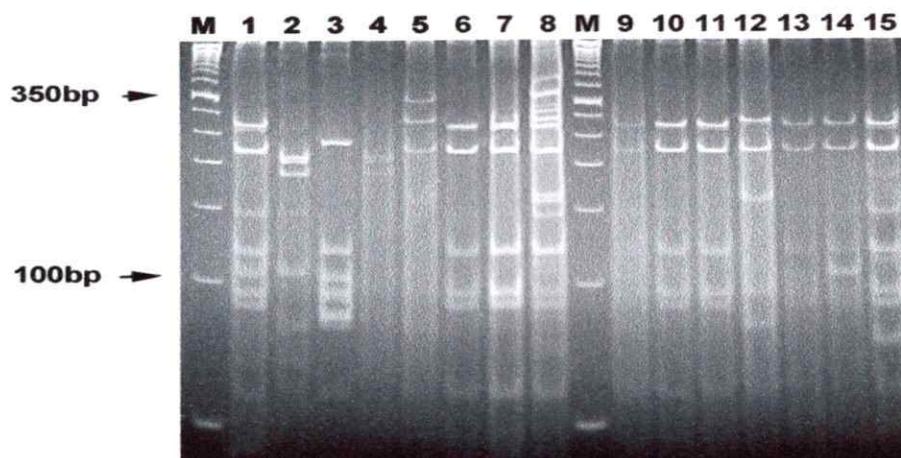


Fig. 5

Marcadores RFLP. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en buffer TBE teñidos con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con los productos de digestión del amplificado de la región IGS entre *nifD-nifK* con la enzima *Bst*UI.

Líneas M, marcador de peso molecular 50 bp; 1) ChI5; 2) ChI7; 3) Allo2; 4) ReI6; 5) DtI2; 6) ReI7; 7) Tq15; 8) Tq20; 9) TtI11; 10) TtI42; 11) ChI2; 12) DtI1; 13) ChI3; 14) ChI4; 15) DsI12

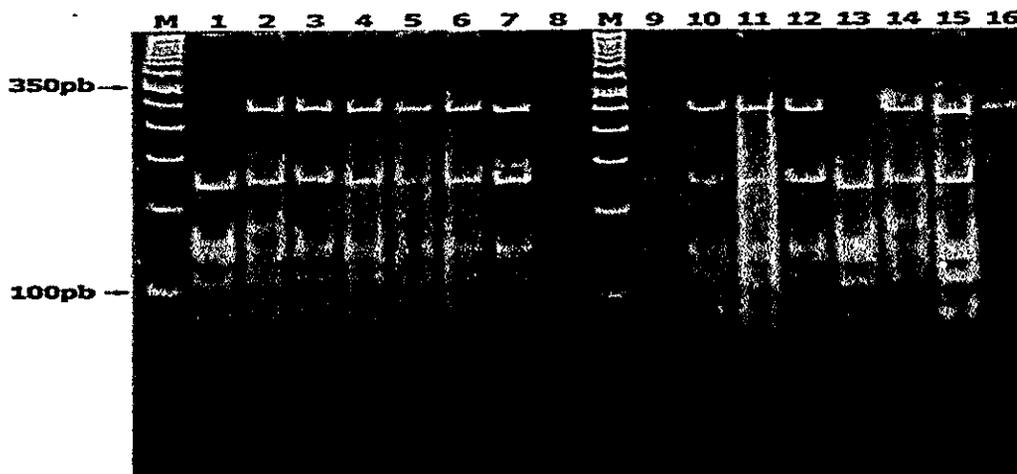


Fig. 6

Marcadores RFLP. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en buffer TBE teñido con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con los productos de digestión del amplificado de la región IGS entre *nifD-nifK* con la enzima *MspI*. Línea M marcador 50 bp

1) BR, 2) tII1 , 3) DsI12 , 4) DtI1 , 5) ChI1 , 6) ChI2 , 7) Rel6 , 8) ChI4 , 9) ChI3 , 10) DH2 , 11) Tq20 , 12) Rel7 , 13) Allo2 , 14) TtI42 , 15) Tq15 , 16) ChI7

Tabla 4. Fragmentos de restricción (en pb) obtenidos por digestión del producto amplificado de la región IGS *nifD-nifK* con diferentes enzimas de restricción para las distintas cepas de *Frankia*

Cepa	Enzimas			
	<i>Bst</i> UI	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I
ChI1	270-230-145-120-110-95-90	260-250-100	170-130	300-170-120-110
ChI2	270-230-120 95-90	260-250-210-100	170-130	300-170-120-110
ChI3	270-230-120-110	260-250-160	170-130	300-170-120-110
ChI4	270-230-120-110	260-250	170-130	300-170-120-110
ChI7	210-190-145-110	260-250-100	360-270-170-130	300-270
DsI12	270-230-190-145-120- 95-90	360-150-130	190-170-130	300-170-120-110
DtI1	270-230-160	320-290-130-120-100	170-130	300-170-120-110
DtI2	350-270-230	320-290-130-120-100	170-130	300-170-120-110
ReI6	210-200-190	310-260-250-160	170-130	300-190-170-120-110
ReI7	270-230-120-95-90	260-250	170-130	300-170-120-110
Tq15	270-230-120-95-90	360-210-130	170-130	300-170-120-110
Tq20	270-230-160-145-120-95-90	260-250	170-130	300-170-120-110
TtI42	270-230-120-95-90	260-250	170-130	300-170-140-120-110
TtI11	270-230-120-95-90	260-250	170-130	300-170-140-120-110
BR	240 -120-100-95-80	260-250-210-140-130-100	360-170-120-110	170-130-120-110
Allo2	240-120-100-95-80	260-250-210-140-130-100	360-300-170-130	170-120-110

hubo variación en el número de bandas obtenido con cada una de las enzimas de restricción, obteniéndose un total de 15 fragmentos variantes para la enzima *Bst*UI, 14 fragmentos para *Hae*III y 8 fragmentos para *Hha*I y *Msp*I.

La combinación de bandas obtenida con cada enzima de restricción permitió asignar un patrón para cada cepa que se definió como haplotipo y que se identificó con la letra inicial de la enzima de restricción utilizada.

La tabla 5 muestra los diferentes haplotipos obtenidos para la región IGS *nifD-nifK*. Con la enzima *Bst*UI se obtuvieron 10 haplotipos; con la *Hae*III, 9 con *Hha*I, 5 y *Msp*I se obtuvieron 7. La distribución de haplotipos muestra que los patrones obtenidos con las enzimas *Bst*UI y *Hae*III exhiben mayor variabilidad que aquellos obtenidos con *Hha*I y *Msp*I. Para el caso de *Hha*I la mayoría de las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae presenta el haplotipo h_1 , de manera similar las cepas nativas en su mayoría exhiben el haplotipo M_3 con *Msp*I.

Por otra parte las cepas de referencia usadas (BR y Allo2) presentan haplotipos distintos a las cepas de *Frankia* nativas con las cuatro enzimas de restricción ensayadas.

La diversidad genética del grupo de 16 cepas de *Frankia* se estimó a partir de las bandas de restricción obtenidas en las cuatro reacciones de digestión. Un total de 45 bandas distribuidas de la siguiente manera: 15 con *Bst*UI, 14 con *Hae*III, 8 bandas con *Hha*I y 8 con *Msp*I, que se compararon para establecer el

Tabla 5. Patrones RFLP obtenidos a partir de la región IGS *nifD-nifK* de *Frankia*.

CEPA	<i>Bst</i> UI	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I
ChI1	B ₁	H ₇	h ₁	M ₃
ChI2	B ₆	H ₃	h ₁	M ₃
ChI3	B ₉	H ₅	h ₁	M ₃
ChI4	B ₉	H ₁	h ₁	M ₃
ChI7	B ₂	H ₈	h ₂	M ₇
Ds12	B ₁₀	H ₉	h ₄	M ₃
DtI1	B ₈	H ₈	h ₁	M ₃
DtI2	B ₅	H ₈	h ₁	M ₃
Rel6	B ₄	H ₄	h ₁	M ₄
Rel7	B ₆	H ₁	h ₁	M ₃
Tq15	B ₆	H ₆	h ₁	M ₃
Tq20	B ₇	H ₁	h ₁	M ₃
TtI11	B ₆	H ₁	h ₁	M ₂
TtI42	B ₆	H ₁	h ₁	M ₆
BR	B ₃	H ₂	h ₃	M ₁
Allo2	B ₃	H ₂	h ₅	M ₅

grado de similitud de las cepas. El dendrograma obtenido se muestra en la fig. 7.

La mayoría de las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae se agrupan en un cluster con una similitud superior al 50% con la excepción de dos cepas ChI7 y ReI6 que forman un cluster independiente separado de todas las otras cepas en estudio y con baja similitud entre ellas.

2.2 Región IGS ribosomal 16S-23S

Un fragmento de 2000 pb se amplificó con los partidores FDI y FGPL2054 (fig.4). Usando estos partidores se obtuvo amplificación para todas las cepas listadas en la tabla 1.

Las figuras 8 y 9 muestran un ejemplo de patrones de restricción obtenidos con la enzima *MspI* y *HaeIII* respectivamente. El análisis de restricción del fragmento amplificado con las enzimas *BstUI*, *CfoI*, *HaeIII* y *MspI*, produjo aproximadamente el mismo número de fragmentos (15-16 fragmentos por enzima). El rango de tamaño varió entre 450 y 100 bp (Tabla 6).

Al igual que para la región *nif*, cada patrón de bandas diferente se registró como un haplotipo. En la tabla 7 se muestran los diferentes haplotipos obtenidos con cada enzima para cada una de las cepas. Con la enzima *BstUI* se obtuvieron 17 haplotipos, con *CfoI* 8; con *HaeIII*, 13 y con *MspI* 14.

El dendrograma obtenido a partir de los marcadores RFLP para la región intergénica ribosomal (Fig. 10) muestra la formación de un cluster con el nodo más interno en aproximadamente un 60% de similitud. Este cluster incluye

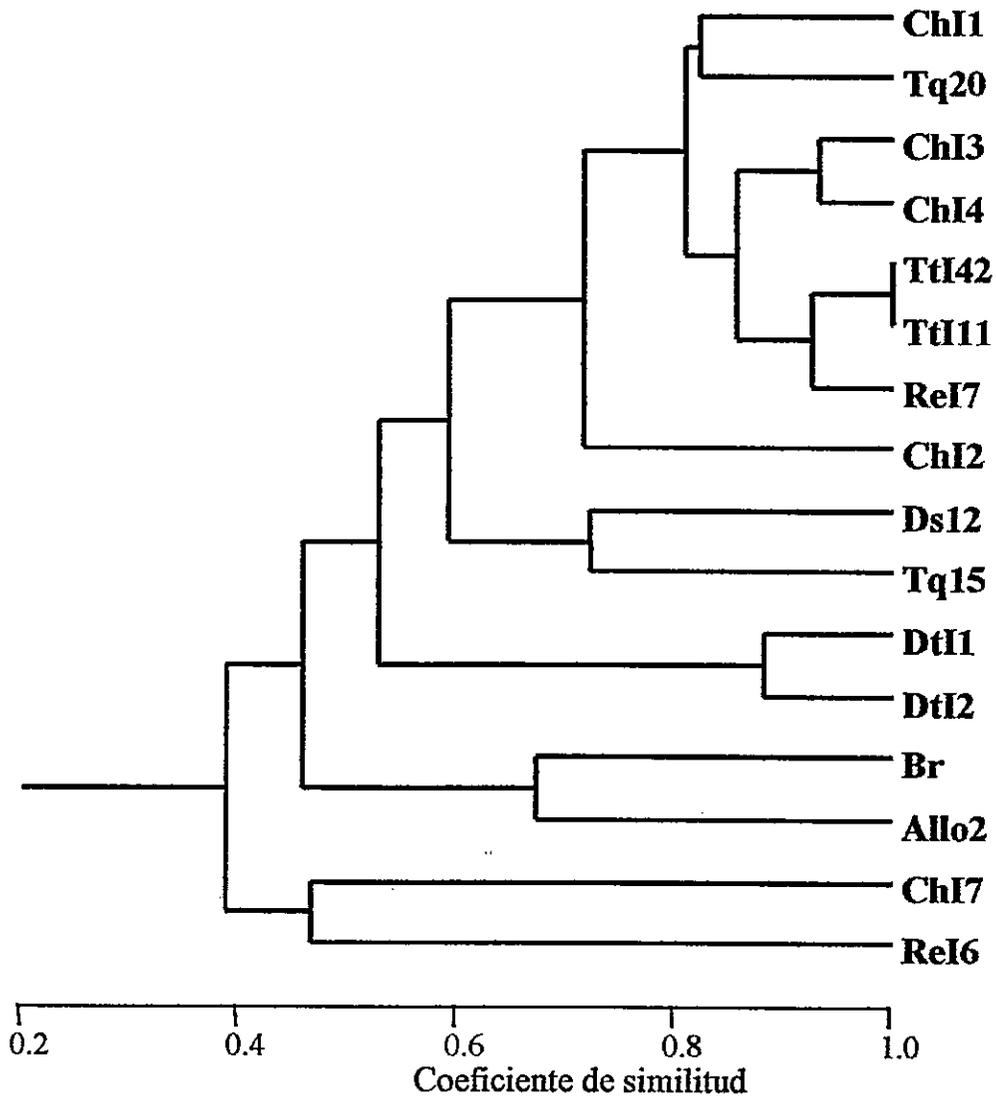


Fig. 7

Dendrograma obtenido mediante análisis de cluster UPGMA de los marcadores PCR-RFLP de la región intergénica *nifD-nifK* utilizando el coeficiente de Jaccard.



Fig.8

Marcadores RFLP. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en buffer TBE teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) con los productos de digestión del amplificado de la región IGS entre 16S-23S con la enzima *MspI*.

Líneas 1 y 10, marcador de peso molecular 50bp; 2), ChI2; 3), DsI12; 4) TtI42; 5) Dtl1; 6) ChI3; 7) Rel6; 8) Dtl1; 9) ChI7; 11) ChI4; 12) TtI11; 13) ChI1; 14) Allo2; 15) EuIb; 16) AacII.

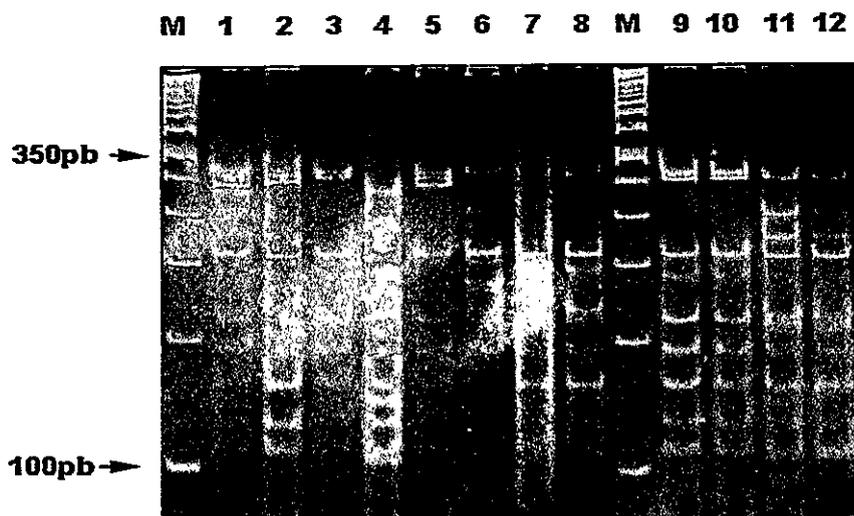


Fig. 9

Marcadores RFLP. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en buffer TBE teñido con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g/ml}$) con los productos de digestión del amplificado de la región IGS entre 16S-23S con la enzima *HaeIII*.

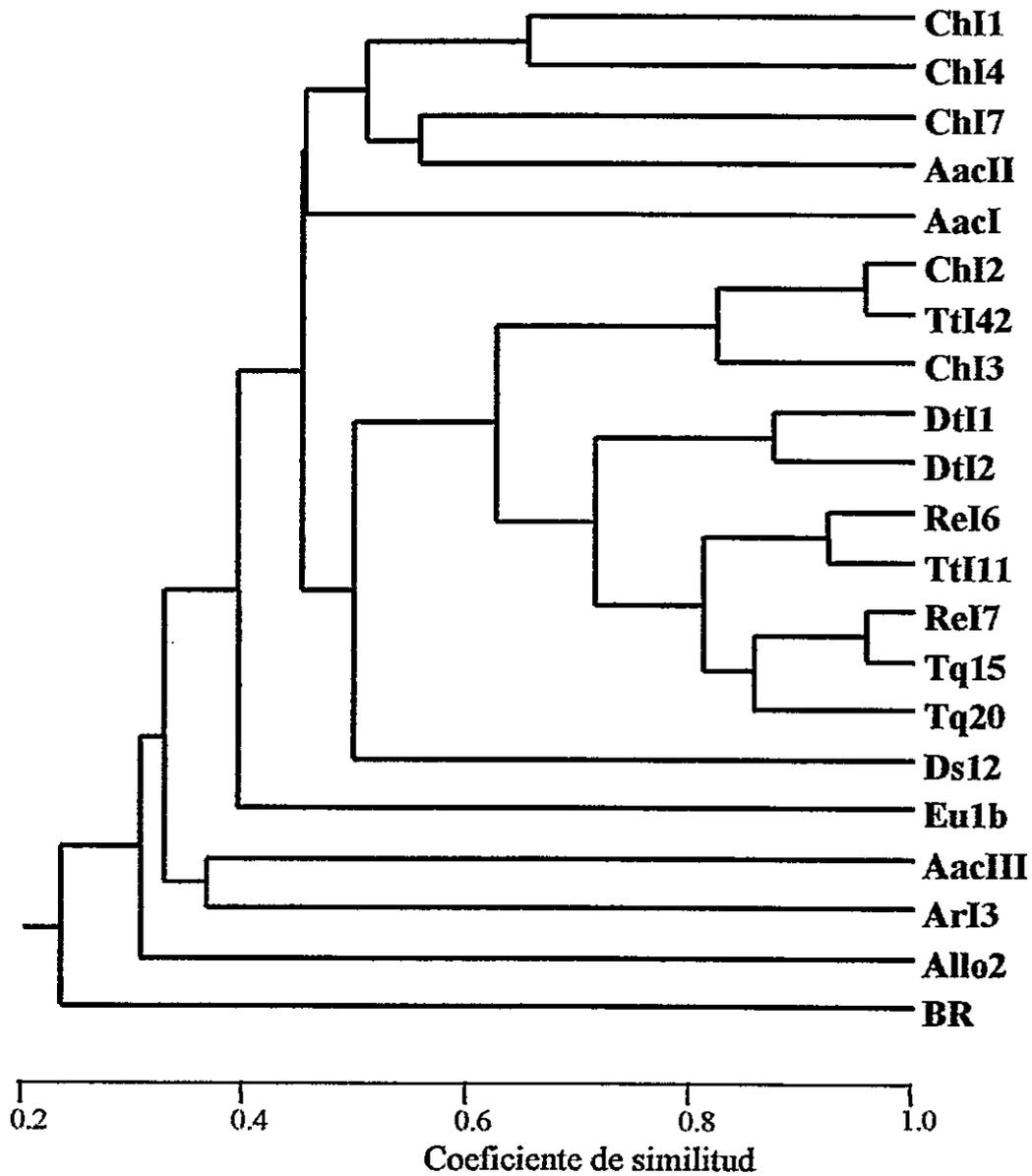
M. marcador de peso molecular 50 bp. 1) ChI7 2) TtI11 3) Rel7, 4) EuIb, 5) ChI3, 6) AacII, 7) Tq20, 8) DsI12, 9) TtI42 10) Rel6 11) Dtl1 12) Dtl2

Tabla 6. Fragmentos de restricción (en pb) obtenidos por digestión del producto amplificado de la región IGS 16S-23S con diferentes enzimas de restricción para las distintas cepas de *Frankia*

Cepa	Enzimas			
	<i>Bst</i> UI	<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I
ChI1	360-300-210-190-160-150	370-320-240-120	300-210-160-140-130	380-290-190-175-170-130-120
ChI2	280-210	370-320-240-120	300-210-160-140-130-120-110	380-300-180-120-125-110
ChI3	300-210-190-160	370-320-240-120	300-210-160-140-130-120-110	380-300-180-125-120-110
ChI4	300-250-190	370-320-240-120	300-210-160-140-130	175-170-130
ChI7	360-300-250-210-160	370-320-220-200-140	300-210-160-140-130-120-110	290-175-170-140
DsI12	250-210-150	370-320-240-120	310-210-170-160-130-120-110	270-140-125-110
DtI1	360-300-280-210-160	370-320-240-120	300-250-220-210-160-140-130-120-110	430-380-300-290-190-180-130-125-120-110
DtI2	360-220-210-160-150	370-320-240-120	300-250-220-210-160-140-130-120-110	430-380-300-290-190-180-130-110
Rel6	360-300-210-160-150	370-320-240-120	310-300-210-160-140-130-120-110	430-300-190-180-130-120
Rel7	360-280-210-160-150	370-320-240-120	310-300-210-160-140-130-120-110	430-300-190-180
Tq15	360-280-210-160-150	370-320-240-120	300-210-160-140-130-120-110	430-300-190-180
Tq20	250-210-160-150	370-320-240-120	300-210-160-140-130-120-110	430-300-190-180
TtI11	360-300-210-160-150	370-320-240-120	310-300-210-160-140-130-120-110	430-190-180-130-120
TtI42	280-210	370-320-240-120	310-300-210-160-140-130-120-110	380-300-180-125-120-110
AacI	360-350-300-210-180	370-320-250-120	310-300-210-170-160-140	430-200-190-130-120
AacII	360-350-300-180	370-320-200-180-120	310-300-210-160-140	290-175-170-140
AacIII	450-210-180	370-250-180	310-300-210	380-300-180-170-140
ArI3	400-300-210-200	320-250-120	300-210	380-190-175-170
Br	250-210-190	340-300-180	300-210	280-140
Allo2	210-170	390-370	250-210-140-130	290-175-170-140
EuIb	360-300-220-210	410-370-240-210-170-160	210-150-140-130-125-120-110-100	380-190-180-170-130

Tabla 7. Patrones RFLP obtenidos a partir de la región IGS 16S-23S de *Frankia*.

Cepa	<i>Bst</i> UI	<i>Cfo</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I
ChI1	B ₁₅	C ₁	H ₈	M ₈
ChI2	B ₇	C ₁	H ₇	M ₁
ChI3	B ₉	C ₁	H ₁	M ₁
ChI4	B ₃	C ₁	H ₁₀	M ₆
ChI7	B ₁₃	C ₇	H ₁	M ₅
Dsl12	B ₈	C ₁	H ₅	M ₂
Dtl1	B ₁₂	C ₁	H ₆	M ₃
Dtl2	B ₁₇	C ₁	H ₆	M ₃
Rel6	B ₁₄	C ₁	H ₂	M ₄
Rel7	B ₅	C ₁	H ₂	M ₁₂
Tq15	B ₅	C ₁	H ₁	M ₁₂
Tq20	B ₇	C ₁	H ₁	M ₁₂
Ttl11	B ₁₄	C ₁	H ₂	M ₇
Ttl42	B ₁₀	C ₁	H ₂	M ₁
AacI	B ₆	C ₃	H ₉	M ₁₃
AacII	B ₁₁	C ₅	H ₄	M ₅
AacIII	B ₂	C ₂	H ₁₁	M ₁₄
ArI3	B ₁	C ₄	H ₁₂	M ₁₁
BR	B ₄	C ₇	H ₁₂	M ₁₀
Allo2	B ₆	C ₈	H ₁₃	M ₅
Eu1b	B ₁₆	C ₆	H ₃	M ₉

**Fig 10**

Dendrograma obtenido mediante análisis de cluster UPGMA de los marcadores PCR-RFLP de la región intergénica 16S-23S utilizando la distancia de de Jaccard

solamente a cepas de *Frankia* derivadas de Rhamnaceae con representantes de cepas obtenidas desde los distintos géneros de plantas hospederas. Hay sólo cuatro cepas de *Frankia* de Rhamnáceas que se encuentran fuera de este cluster y son: ChI1, ChI4, ChI7 y DsII2. La similitud entre estas cepas es baja, igual o menor de un 50%. Todas las cepas derivadas de plantas de otras familias tales como: BR y Allo2 (Casuarinaceae), EuIb (Elaeagnaceae), AacI, AacII, AacIII y ArI3 (Betulaceae) presentan baja similitud entre ellas inferior al 40%. No se observan la formación de cluster definidos entre estas últimas cepas mencionadas.

Los resultados sugieren que el análisis PCR-RFLP es un método rápido y efectivo para obtener un “fingerprinting” genómico. Los patrones generados por ambos marcadores moleculares son reproducibles y tienen suficiente polimorfismo para diferenciar cepas de *Frankia* estrechamente relacionadas derivadas de Rhamnaceae.

3. Rango de huésped

3.1. Infectividad y efectividad de las cepas

Para la determinación del rango de huésped de las cepas nativas de Rhamnaceae se utilizó 4 plantas hospederas que pertenecen a distintas familias actinorrhizas: *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae), *Casuarina cumingiana* (Casuarinaceae), *Alnus glutinosa* (Betulaceae) y *Elaeagnus angustifolia*

(Elaeagnaceae). En la tabla 8 se muestra el porcentaje de nodulación obtenido con las distintas cepas sobre las cuatro especies vegetales usadas como blanco. Se puede observar que las plantas de *T. trinervis* además de ser noduladas por las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae, fueron noduladas también por la cepa Eulb aislada de *E. umbellata* (Elaeagnaceae). El mayor porcentaje de nodulación en este género se obtuvo a partir de la cepa Tñ42, con un 100% de las plantas noduladas.

La especie *E. angustifolia* perteneciente a la familia Elaeagnaceae fue nodulada por todas las cepas aisladas de *Rhamnaceae*, observándose hasta un 100% de nodulación con algunas cepas como ChI4, ChI5, Tq15 y Dñ1.

La cepa ChI4 aislada de *Colletia hystrix* exhibe un rango de huésped más amplio ya que además es capaz de inducir nodulación y fijar nitrógeno en simbiosis con *A. glutinosa*. Ninguna cepa de Rhamnaceae es capaz de inducir nódulos en *C. cunninghamiana*. Sólo se observó nodulación con las cepas control BR y Allo2 aisladas desde plantas de la familia Casuarinaceae.

Los experimentos de inoculación cruzada indican que todas las cepas nativas aisladas de la familia Rhamnaceae son capaces de nodular al menos un representante de la familia Elaeagnaceae (*E. angustifolia*) y por lo tanto podrían asignarse al grupo de especificidad 3. Este grupo de especificidad de huésped definido previamente por Baker (1987), incluye a las cepas de *Frankia* que infectan la familia Elaeagnaceae. Los datos obtenidos permiten incluir en este grupo a las cepas de *Frankia* aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae.

Tabla 8. Porcentaje de nodulación inducida por cepas de *Frankia*.

Inóculo ^a	Plantas hospederas			
	<i>T.trinervis</i>	<i>E. angustifolia</i>	<i>A.glutinosa</i>	<i>C.cunninghamiana</i>
Control ^b	0	0	0	0
ChI1	50	80	0	0
ChI2	60	65	0	0
ChI4	ND	100	40	0
DtI1	ND	100	0	0
ReI6	45	85	0	0
TqI5	70	100	0	0
Tq20	60	70	0	0
TtI11	65	40	0	0
TtI42	100	55	0	0
AacIII	0	0	90	0
ArI3	ND	0	15	0
BR	0	0	0	100
Allo2	0	0	0	100
EuIb	85	100	0	0

^a 5 ml de una suspensión bacteriana en Hoagland ¼ sin nitrógeno.

^b no inoculado. ND = no determinado

Número total de plantas inoculadas en cada ensayo = 20

Nota: datos de la columna de *T. trinervis* y *E. angustifolia* corresponden a resultados de la tesis de Magister en Genética de L. Bravo (2002). Se colocaron para propósitos de comparación.

La infectividad de cada cepa se determinó por el número de nódulos por planta, y el peso seco de los nódulos. La efectividad de la asociación simbiótica, es decir capacidad de fijación de nitrógeno se determinó por la actividad específica de nitrogenasa.

Las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae inducen la formación de un menor número de nódulos por planta y más bajo peso seco cuando establecen simbiosis con *T. trinervis* (tabla 9), comparado con los valores observados sobre *E. angustifolia* (tabla 10). Aunque se encuentran algunas excepciones, como por ejemplo TtI42 que produjo un promedio de 2,5 nódulos en *T. trinervis* en contraste con 1.7 sobre *E. angustifolia*. Asimismo, las cepas Tq15 y Tq 20 si bien produce un mayor número de nódulos en *E. angustifolia* su biomasa es reducida. Ningún nódulo fue obtenido en el control sin inocular.

En cuanto al peso seco de los nódulos, se puede observar que en *T. trinervis* (Tabla 9) la mayor biomasa nodular fue inducida por la cepa ChI1 (15.2 mg) y Eu1b (15.3 mg), mientras que el menor valor de peso seco nodular se encuentra en plantas noduladas por ReI6, (5.8 mg).

La actividad de nitrogenasa se determinó como la capacidad de reducción de acetileno a etileno. Las cepas nativas de *Frankia* que establecen nodulación con plantas actinorrhizas son también efectivas en la fijación de nitrógeno ya sea en simbiosis con *Trevoa trinervis* (Tabla 9) como en simbiosis con *Elaeagnus angustifolia* (Tabla 10). Las cepas TtI11 y TtI42 exhiben las más altas actividades específicas de nitrogenasa sobre *T. trinervis* que coincide

Tabla 9. Infectividad y Efectividad de las cepas de *Frankia* en simbiosis con *Trevoa trinervis*^a

Cepa	Nº nódulos x planta ⁻¹	Peso seco nódulos x planta ⁻¹ (mg)	Actividad específica Nitrogenasa (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ peso seco nódulo)
Control	0.0	0.0	0.0
ChI1	1.3 ± 0.4	15.2 ± 3.7	8.1 ± 2.7
ChI2	2.2 ± 0.4	11.2 ± 4.2	2.1 ± 0.7
ReI6	1.3 ± 0.4	5.8 ± 1.4	7.0 ± 2.1
Tq15	1.4 ± 0.5	7.9 ± 1.4	1.7 ± 0.3
Tq20	1.6 ± 0.5	13.2 ± 2.9	1.4 ± 0.3
TtI11	1.7 ± 0.6	7.5 ± 2.5	14.1 ± 3.9
TtI42	2.5 ± 0.5	14.9 ± 4.4	14.3 ± 3.1
Eu1b	2.1 ± 0.8	15.3 ± 4.7	1.5 ± 0.4

^aPlántulas de *T. trinervis* se inocularon con 5 ml de suspensión bacteriana equivalente a 3 µg mL⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Los valores corresponden a la media ± SD

Tabla 10. Infectividad y Efectividad de las cepas de *Frankia* en simbiosis con *Elaeagnus angustifolia*^a

Cepa	Nº nódulos x planta ⁻¹	Peso seco nódulos x planta ⁻¹ (mg)	Actividad específica Nitrogenasa (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ peso seco nódulo)
Control	0.0	0.0	0.0
ChI1	2.2 ± 0.6	21.5 ± 6.4	13.0 ± 5.3
ChI2	4.1 ± 1.9	21.0 ± 4.2	8.9 ± 3.1
ChI4	4.5 ± 1.1	15.4 ± 5.2	4.0 ± 1.5
DtI1	4.2 ± 2.4	15.7 ± 4.8	15.8 ± 6.7
ReI6	4.2 ± 1.2	37.3 ± 7.6	6.8 ± 2.1
TqI5	2.7 ± 0.8	5.2 ± 1.5	35.7 ± 8.5
Tq20	4.4 ± 1.8	8.3 ± 2.1	45.7 ± 9.3
TtI11	2.3 ± 1.1	43.1 ± 8.1	15.4 ± 3.7
TtI42	1.7 ± 0.4	75.8 ± 9.5	4.5 ± 2.3
EuIb	6.4 ± 2.3	27.6 ± 7.3	5.9 ± 2.4

^a Plántulas de *E. angustifolia* se inocularon con 5 ml de suspensión bacteriana equivalente a 3 µg mL⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Los valores corresponden a la media ± SD

con su hospedero original (Tabla 9). Las otras cepas presentan actividades menores pero todas ellas son capaces de establecer una simbiosis efectiva con *T. trinervis*. Bajo las mismas condiciones de ensayo, las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnáceas son también infectivas y efectivas en la fijación de nitrógeno sobre *E. angustifolia* (Tabla 10).

En la tabla 9 podemos observar que existen marcadas diferencias en la actividad específica de nitrogenasa presente en los nódulos de *T. trinervis* inducidos por las cepas nativas de *Frankia*. Por ejemplo las cepas TtI42 y TtI11 son las que muestran los valores mas altos, 14.3 y 14.1 respectivamente, que difieren significativamente de los valores obtenidos en nódulos inducidos por cepas como ChI2 (2.1), Tq15 (1.7), Tq20, (1.4); y de la cepa aislada de *Elaeagnaceae*, Eu1b (1.5). Esta variabilidad en la actividad de nitrogenasa también se observa en nódulos inducidos en *E. angustifolia*. La tabla 10 muestra que la enzima es más activa en los nódulos producidos por la cepa Tq20, (45.7), y Tq15 (35.7) lo cual es significativamente diferente de la actividad encontrada en los nódulos obtenidos con la cepa control Eu1b, (5.9). El rango de variación de la actividad enzimática de los nódulos producidos por las diferentes cepas es bastante amplio, encontramos valores que van desde 4.0 con la cepa ChI4, hasta 45.7 con la cepa Tq20. La raíz de plantas no inoculadas no presenta ninguna actividad enzimática.

En los experimentos de inoculación cruzada se realizaron varios controles positivos con cepas de stock BR y Allo2 en *C. cunninghamiana* (Tabla 11), Eu1b en *E. angustifolia* (Tabla 10) y ArI3 en *A. glutinosa* (Tabla 12). Los controles

Tabla 11. Infectividad y Efectividad de las cepas de *Frankia* en simbiosis con *Casuarina cunninghamiana* ^a

Cepa	Nº nódulos x planta ⁻¹	Peso seco nódulos x planta ⁻¹ (mg)	Actividad específica Nitrogenasa (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ peso seco nódulo)
Control	0.0	0.0	0.0
BR	6.0 ± 1.6	34.2 ± 9.8	27.9 ± 5.2
Allo2	9.5 ± 2.8	43.0 ± 6.9	27.0 ± 2.8

^a Plántulas de *Casuarina cunninghamiana* se inocularon con 5 ml de suspensión bacteriana equivalente a 3 µg mL⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Los valores corresponden a la media ± SD

Tabla 12. Infectividad y Efectividad de las cepas de *Frankia* en simbiosis con *Alnus glutinosa*^a

Cepa	Nº nódulos x planta ⁻¹	Peso seco nódulos x planta ⁻¹ (mg)	Actividad específica Nitrogenasa (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ peso seco nódulo)
Control	0.0	0.0	0.0
ChI4	1.1 ± 0.4	4.5 ± 0.6	23.5 ± 9.7
AacIII	12.7 ± 4.1	26.0 ± 4.7	9.8 ± 3.9
ArI3	1.0 ± 0.0	16.3 ± 1.5	0.8 ± 0.09

^a Plántulas de *Alnus glutinosa* se inocularon con 5 ml de suspensión bacteriana equivalente a 3 µg mL⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Los valores corresponden a la media ± SD

positivos permiten confirmar o descartar la posibilidad de cepas atípicas Nod-/Fix- entre las cepas que se están ensayando. Un hallazgo novedoso constituye la cepa ChI4 que tiene un amplio rango de huésped y establece simbiosis efectiva con *A. glutinosa* (Betulaceae) con altos valores de actividad de nitrogenasa comparado con cepas aisladas desde plantas actinorrhizas de la familia Betulaceae usadas como control (Tabla 12).

De acuerdo al número de nódulos presentes en cada planta, podemos ver que la cepa aislada de *A. acuminata*, AacIII, fue la más infectiva sobre *A. glutinosa* (Tabla 12) ya que produjo 12 nódulos con la mayor biomasa, aunque este efecto no refleja una mayor efectividad en la fijación de nitrógeno.

Si bien los datos de infectividad y efectividad de las cepas presentan importantes diferencias entre los pares planta-bacteria ensayadas, estas diferencias no son exclusivamente debido a las cepas de *Frankia*, ya que las plantas utilizadas en los ensayos son genéticamente heterogéneas. No obstante, los datos obtenidos permiten concluir que las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnáceas son promiscuas en el establecimiento de la simbiosis ya que son capaces de infectar y fijar nitrógeno con plantas pertenecientes a otra familia.

3.2. Efecto de la nodulación inducida por *Frankia* sobre el crecimiento de las plantas

Con el fin de determinar el efecto de la nodulación sobre el crecimiento de las plantas hospederas, se evaluaron los siguientes parámetros de crecimiento: altura del tallo (cm), peso seco de las plantas (mg), diámetro del tallo a la altura

del cuello (mm) y contenido de nitrógeno total (%), los cuales son indicativos del efecto que tiene el nitrógeno fijado por las cepas en simbiosis sobre las diferentes plantas. En la tabla 13 podemos observar los efectos de la inoculación de cepas de *Frankia* sobre las plantas de *T. trinervis*. El mayor efecto se obtuvo con la cepa Eu1b (Elaeagnaceae) con valores de 20.6 cm para altura del tallo, 575 mg, para peso seco y 2.8 mm para diámetro del tallo. Todas las cepas de *Frankia* aisladas de *Rhamnaceae* también tuvieron un efecto positivo sobre todos los parámetros estudiados comparado con el control no nodulado. Si consideramos altura, peso seco y diámetro del tallo las cepas con mayor efecto sobre *T. trinervis* fueron Tq20, TtI11 y TtI42. El contenido de nitrógeno total fue también mayor en las plantas noduladas por Tq20 y TtI11 (tabla 13).

En la tabla 14 se muestra el efecto de la nodulación sobre *E. angustifolia*. Si bien la mayoría de las cepas producen un aumento en la altura del tallo, biomasa y diámetro del tallo, el mejor efecto se obtuvo con la cepa TtI42 que produce un aumento del 58% en la altura, un 100% en el peso seco, 150% en el diámetro del tallo y un 91% en el contenido de nitrógeno total. El efecto de las otras cepas fue bastante similar entre ellas, aunque se observa que la Tq15 y Tq20 no tuvieron efecto sobre la altura de la planta en comparación con el control, y no produjeron un aumento importante del peso seco. El diámetro del tallo a la altura del cuello se considera una característica importante de la calidad y vigor de la planta ya que se encuentra asociado al grado de lignificación de la planta.

Tabla 13. Efecto de la inoculación con cepas de *Frankia* sobre el crecimiento de *Trevoa trinervis*^a

Cepa	Altura tallo (cm)	Peso Seco (mg)	Diámetro tallo (mm)	Nitrógeno Total (%)
Control ^b	12.8 ± 1.2	248 ± 39	1.7 ± 0.3	1.10
ChI1	15.9 ± 3.8	309 ± 78	1.8 ± 0.4	1.39
ChI2	16.1 ± 2.8	373 ± 94	2.1 ± 0.4	1.42
ReI6	15.6 ± 1.4	270 ± 58	2.3 ± 0.2	1.67
Tq15	14.6 ± 3.1	331 ± 78	2.1 ± 0.3	1.43
Tq20	17.9 ± 4.7	486 ± 97	2.6 ± 0.4	1.75
TtI11	18.5 ± 3.5	485 ± 89	2.5 ± 0.2	1.85
TtI42	19.0 ± 2.2	491 ± 79	2.3 ± 0.3	1.41
Eu1b	20.6 ± 3.4	575 ± 98	2.8 ± 0.3	1.39

^a Plántulas de 3 meses de edad de *T. trinervis* se inocularon con 5 ml de una suspensión bacteriana equivalente a 3 µg ml⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Cada valor es la media ± SD medida ocho meses después de la inoculación (n= 20 plántulas).

^b Control corresponde a plantas no inoculadas.

Tabla 14. Efecto de la inoculación con cepas de *Frankia* sobre el crecimiento de *Elaeagnus angustifolia*^a

Cepa	Altura tallo (cm)	Peso Seco (mg)	Diámetro tallo (mm)	Nitrógeno Total (%)
Control ^b	12.5 ± 1.9	293 ± 47	1.4 ± 0.3	1.45
Ch11	13.9 ± 1.6	450 ± 68	2.5 ± 0.4	2.05
Ch12	13.6 ± 1.7	405 ± 67	1.8 ± 0.2	1.96
Ch14	14.0 ± 1.9	452 ± 65	2.3 ± 0.3	2.24
Dt1	15.5 ± 2.3	496 ± 90	2.4 ± 0.6	3.02
Re16	14.9 ± 2.4	504 ± 90	2.6 ± 0.4	2.72
Tq15	12.4 ± 1.2	342 ± 70	2.0 ± 0.3	2.44
Tq20	12.3 ± 1.6	334 ± 50	2.3 ± 0.3	1.99
Tf11	15.3 ± 2.5	331 ± 71	2.5 ± 0.3	2.75
Tf142	19.8 ± 3.8	591 ± 34	3.5 ± 0.6	2.78
Eu1b	15.2 ± 2.8	384 ± 68	3.4 ± 0.6	3.36

^a Plántulas de 3 meses de edad de *E. angustifolia* se inocularon con 5 ml de una suspensión bacteriana equivalente a 3 µg ml⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Cada valor es la media ± SD medida ocho meses después de la inoculación (n= 20 plántulas).

^b Control corresponde a plantas no inoculadas.

Los datos indican que las plantas de *E. angustifolia* noduladas son más robustas que las no noduladas (tabla 14) en todas las parejas *E. angustifolia* - *Frankia* estudiadas. Si se comparan las plantas de *T. trinervis* (tabla 13) y *E. angustifolia* (tabla 14), se observa que el rango de distribución de las plantas en relación con la altura, peso seco y diámetro del cuello es similar. Sin embargo, todas las plantas noduladas de *E. angustifolia* (tabla 14) presentan mayores valores de nitrógeno total comparadas con plantas de *T. trinervis* (Tabla 13).

En la tabla 15 se muestra el efecto de la nodulación inducida por *Frankia* sobre *A. glutinosa*. Las plantas noduladas por ChI4, la única cepa de *Frankia* de Rhamnaceae infectiva y efectiva sobre esta planta hospedera, no tiene un efecto detectable sobre el crecimiento y contenido de nitrógeno total de la planta comparado con el control sin inocular. Las otras dos cepas (AacIII y ArI3) utilizadas como control no mejoraron significativamente el crecimiento de la planta. Una posible dificultad para determinar diferencias significativas entre tratamientos y controles en esta especie puede deberse a que *A. glutinosa*, es una especie forestal de mayor envergadura y de más lento crecimiento, por lo tanto cambios en su desarrollo durante el período de estudio son más difíciles de detectar.

En la Tabla 16 se muestra el efecto de las cepas control (BR y Allo2) sobre *C. cunninghamiana*. Ambas cepas aisladas de Casuarinaceae fueron capaces de mejorar el crecimiento de las plantas mostrando valores considerablemente mayores en cuanto la altura del tallo y peso seco total en comparación con las

plantas sin inocular. También se observó un gran incremento en el nitrógeno contenido por las plantas inculadas duplicando el contenido por las plantas sin inocular.

Tabla 15. Efecto de la inoculación con *Frankia* sobre el crecimiento de *Alnus glutinosa*^a

Inóculo	Altura tallo (cm)	Peso seco total (mg)	Diámetro del tallo (mm)	Nitrógeno Total (%)
Control ^b	7.4 ± 0.8	239 ± 73	2.4 ± 0.2	1.26
ChI4	9.2 ± 3.2	279 ± 41	2.2 ± 0.4	1.31
AacII	9.1 ± 2.7	311 ± 64	2.6 ± 0.2	1.87
ArI3	8.1 ± 3.6	235 ± 91	2.5 ± 0.3	1.42

^a Plántulas de 3 meses de edad de *Alnus glutinosa* se inocularon con 5 ml de una suspensión bacteriana equivalente a 3 µg ml⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Cada valor es la media ± SD medida ocho meses después de la inoculación (n= 20 plántulas).

^b Control corresponde a plantas no inoculadas.

Tabla 16. Efecto de la inoculación con *Frankia* sobre el crecimiento de *Casuarina cunninghamiana* ^a

Inóculo	Altura tallo (cm)	Peso seco total (mg)	Diámetro del tallo (mm)	Nitrógeno Total (%)
Control ^b	16.5 ±1.4	528 ±90	1.4 ± 0.2	0.76
BR	20.5 ±3.2	735 ±105	2.6 ± 0.4	1.44
Allo2	22.4 ±3.4	812 ±101	2.1 ± 0.3	1.74

^a Plántulas de 3 meses de edad de *Casuarina cunninghamiana* se inocularon con 5 ml de una suspensión bacteriana equivalente a 3 µg ml⁻¹ de proteína total en Hoagland ¼ sin nitrógeno. Cada valor es la media ± SD medida ocho meses después de la inoculación (n= 20 plántulas).

^b Control corresponde a plantas no inoculadas.

DISCUSION

Diversidad de las cepas de *Frankia*

En principio, toda la información genotípica, fenotípica y filogenética puede utilizarse en los estudios de diversidad genética aplicados a la tipificación y sistemática bacteriana (Vandamme *et al.*, 1996). La información genotípica, basada en los ácidos nucleicos, emplea diferentes genes o regiones génicas, mientras que la información fenotípica esta derivada del polimorfismo de proteínas, de marcadores quimiotaxonómicos u otros rasgos expresados como la morfología y fisiología.

Los estudios de diversidad y sistemática bacteriana utilizan numerosas y diferentes moléculas como marcadores con variadas aplicaciones. Así, la selección del marcador genético, como la técnica empleada en la tipificación depende del nivel de resolución que se desee obtener y del tipo de estudio que se desee abordar. Por ejemplo, la secuencia de los genes ribosomales 16S es adecuada para estudios filogenéticos ya que el marcador es una molécula que presentan regiones muy conservadas que permiten trazar la historia evolutiva de grupos taxonómicos mayores y regiones menos conservadas que permite discriminar entre microorganismos más relacionados.

Otros marcadores genéticos, como los patrones de restricción RFLP, o de amplificación del DNA por PCR como RAPDs, rep-PCR son muy variables y

generalmente se utilizan para tipificar cepas dentro de una especie o género bacteriano (Vandamme *et al.*, 1996).

Los marcadores genéticos RFLP y RAPDs son ampliamente utilizados en la identificación de individuos con importante aplicaciones en el análisis genético, identificación de cepas y en la comprensión de la estructura y evolución de poblaciones microbianas (Welsh y MacClelland, 1990; Megnegneau *et al.*, 1993; Stefan *et al.*, 1997). El propósito de este estudio fue establecer el nivel de variabilidad genética que existe entre las diferentes cepas de *Frankia* aisladas desde nódulos radiculares de plantas de la familia Rhamnaceae. Las cepas en estudio están estrechamente relacionadas tanto por su origen geográfico como por ser simbioses de una misma familia de plantas: Rhamnaceae (Carú, 1993; Carú, 1999). Estas cepas presentan bajo polimorfismo tanto en su morfología como en sus requerimientos nutricionales y capacidad de fijación de nitrógeno (Carú 1993). Asimismo, en un análisis enzimático multilocus exhiben un alto grado de similitud genética (Bravo, 2002). Por otra parte la mayoría de las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnáceas se agrupan en un cluster de acuerdo al análisis filogenético basado en el rDNA 16S (Clawson *et al.*, 1998).

Dado que las cepas en estudio están estrechamente relacionadas y presentan bajo polimorfismo genético, fue necesario buscar marcadores más variables como RAPDs y PCR-RFLP de regiones intergénicas para su tipificación.

La metodología RAPD's permite obtener un gran número de marcadores genéticos aleatorios y no requiere un conocimiento previo del genoma (Welsh y McClelland, 1990). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los marcadores RAPD's tiene gran poder de discriminación entre los distintos aislados de

Frankia. El número de partidores seleccionados fue suficiente para generar patrones de bandas distintivos entre las cepas de *Frankia*.

Como se muestra en la tabla 3, si bien hay bandas compartidas entre las cepas, existe aún suficiente heterogeneidad genética para su identificación. Para los propósitos del análisis los fragmentos que comigran en las distintas cepas se supone representan regiones homólogas dentro del genoma. Sin embargo, una limitación del método es que igual tamaño de las bandas no es una evidencia per se que los individuos comparten el mismo fragmento homólogo. La variabilidad encontrada se observa más claramente en el dendrograma (Fig. 3) que muestran bajo coeficiente de similitud entre las cepas. También puede observarse que no hay agrupamientos que indiquen una asociación entre cepas aisladas de una misma familia o género de plantas.

De los datos también se concluye que los marcadores RAPDs no son apropiados para definir relaciones filogenéticas entre las cepas ya que presentan un grado similar de variabilidad entre cepas que infectan plantas de una misma especie como de plantas pertenecientes a distintos géneros o familias. Sin embargo, esta metodología es útil para estudiar la variabilidad genética entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas, las cuales se espera que exhiban un alto grado de similitud genética, como ocurre con las cepas en estudio. Resultados obtenidos en el laboratorio mediante análisis enzimático multilocus revela que las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae presentan patrones enzimáticos idénticos en varios loci (Bravo, 2002), sin embargo son identificables por marcadores RAPD's. Similares observaciones se hicieron por Wang *et al.*, (1993) quienes mostraron que los marcadores RAPDs son más sensibles para la identificación de cepas que el análisis enzimático multilocus. También estos marcadores se han usado

para identificar cepas de *Frankia* que infectan plantas del género *Casuarina* (Sellsted, 1992).

Alternativamente, Los marcadores PCR-RFLP se usan frecuentemente para tipificar especies bacterianas. El método esta basado en la amplificación de regiones específicas del genoma y una posterior identificación del polimorfismo de restricción en el amplicón correspondiente (Olive, 1999).

Para evaluar el grado de diversidad genética presente en este conjunto de cepas se realizó un análisis PCR-RFLP correspondiente a regiones intergénicas, las cuales en general muestran mayor variabilidad que las regiones codificantes que ellas separan. Para el estudio se utilizó la amplificación de la región IGS que separa los genes que codifican el RNA ribosomal 16 y 23S y la región entre los genes *nifD-nifK*.

Se ha observado que la región intergénica entre *nifD-nifK* presenta mayor longitud y variabilidad entre cepas que la región *nifH-nifD* (Jamman, 1993; Lumini, 1996a; Nalin, 1995). Asi, Cournoyer *et al.*, (1993), estudiando el polimorfismo de secuencia en la región intergénica *nifH-nifD* de especies genómicas de *Frankia* del grupo de especificidad de *Elaeagnus*, encontró que algunas de ellas no pueden diferenciarse por el bajo polimorfismo en esta región IGS, pero si se pueden discriminar utilizando la región IGS *nifD-nifK* (Lumini, 1996a; Nalin, 1995).

En nuestro estudio, la IGS seleccionada entre *nifD-nifK* mostró un tamaño de 1050 pb el cual aparentemente no varió de una cepa a otra (fig.4), excepto en las cepas de *Alnus* las cuales no dieron amplificadas. Este hecho también había sido reportado en estudios anteriores realizados en cepas aisladas de *Ceanothus* donde sólo se obtuvo amplificación positiva en algunas cepas (Ritchie, 1999).

Para generar patrones RFLP se utilizaron enzimas de restricción de corte frecuente que reconocen 4 pb ricas en GC. Esto aumentaría la probabilidad de encontrar sitios de corte (polimorfismo) ya que *Frankia* tiene un genoma con un alto porcentaje de GC (An *et al.*, 1983).

Se obtuvo un mayor número de haplotipos para la región ribosomal comparada con la región IGS *nif*, para todas las enzimas de restricción ensayadas. La mayor variabilidad encontrada a nivel de la región IGS ribosomal puede entenderse, ya que el tamaño de la región amplificada es casi el doble de tamaño que la región IGS *nif* (fig.4).

En general, el poder de discriminación de estas regiones intergénicas es bastante alto y ha sido reportado por otros autores (Lumini y Bosco, 1996a) en los que se pudo caracterizar *Frankia* aislada de *Alnus* a nivel de cepa. De igual manera PCR-RFLP fueron útiles en la identificación de la variabilidad genética de una población de *Frankia* de *Casuarina* en la que se mostró que las 30 cepas estudiadas se distribuyen en 5 grupos RFLP (Rouvier *et al.*, 1996)

Utilizando esta misma metodología, Maggia *et al.*, (1992) encontraron que la mayoría de las cepas *Frankia* aisladas de *Casuarina equisetifolia* en Senegal y Gambia, mostraban patrones de restricción muy similares entre sí y que todas ellas están estrechamente relacionadas con la cepa de referencia CeD, una cepa típica de *Frankia* aislada desde *C. equisetifolia*. Estos resultados indican que la mayoría de las cepas analizadas podrían pertenecer a la misma especie genómica que la cepa de referencia (Maggia *et al.*, 1992). La baja diversidad de las cepas de *Frankia* aisladas desde *Casuarina* en Africa podría también ser consecuencia de que esta especie vegetal es

nativa de Australia e Islas del Pacífico y que en todos aquellos lugares en que ha sido introducida ha llevado consigo sólo una fracción de la diversidad de los microsimbiontes. La homogeneidad genética exhibida por las cepas de *Frankia* aisladas de Casuarinaceae que crecen fuera de su área de distribución geográfica nativa ha sido confirmada en otros estudios utilizando los mismos marcadores genéticos (Rouvier *et al.*, 1992, 1996; Perez *et al.*, 1999). En nuestro estudio las cepas que se analizan se aislaron desde plantas nativas y por tanto es esperable encontrar un mayor polimorfismo genético ya que toda la diversidad asociada al microsimbionte estaría representada en el rango de distribución de la planta huésped. Los resultados de esta tesis muestran que con excepción de la enzima *CfoI*, donde el haplotipo C1 es compartido por la mayoría de las cepas nativas, las demás enzimas revelan algún grado de diversidad genética entre ellas. Por otra parte estudios realizados sobre 128 aislados de *Frankia* desde nódulos radiculares de *Gymnostoma* (Casuarinaceae) muestran una reducida variabilidad del microsimbionte. Utilizando marcadores RFLP-*HaeIII* y RFLP-*MspI* para la región IGS 16S-23S, ellos se distribuyen en solo 4 grupos siendo dos de ellos mayoritarios ya que reúnen a microsimbiontes asociados a las diferentes especies de *Gymnostoma* en sus diferentes habitats (Gauthier *et al.*, 1999). En esta tesis, por el contrario, cuando se analizaron 5 cepas aisladas desde una misma especie *Colletia hystrix* tales como ChI1, ChI2, ChI3, ChI4 y ChI7, todas ellas exhiben un haplotipo distintivo cuando se combinan los patrones obtenidos con las distintas enzimas, para ambas regiones IGS (Tabla 5 y 7). Esto nos da una idea de la mayor variabilidad que existe entre las cepas aisladas de Rhamnaceas comparadas con cepas aisladas desde otras familias de plantas actinorrhizas.

Los resultados obtenidos a partir de las cepas de Rhamnaceae utilizando la región *nifD-nifK* son comparables con los obtenidos en cepas aisladas de Elaeagnaceae (Jamman *et al.*, 1993), en los que se encontró un gran poder de discriminación. Por ejemplo, se obtuvieron 10 patrones diferentes en 12 cepas utilizando la enzima *HaeIII*. En cambio, en estudios realizados con simbiontes obtenidos de otro género de Rhamnaceae como *Ceanothus*, se obtuvieron sólo 4 grupos de RFLP utilizando 7 enzimas de restricción para la región IGS 16S-23S, observándose poca variabilidad entre simbiontes de un mismo género (Ritchie y Myrold, 1999). Estudios del microsimbionte *Frankia* asociadas a distintas poblaciones de la planta huésped *Ceanothus*, revela que la región IGS 16-23S posee baja variabilidad genética sugiriendo que las cepas están estrechamente relacionadas a nivel intraespecífico (Jeong y Myrold, 1999).

Los datos obtenidos indican que los marcadores RFLP de la regiones IGS ribosomal y *nif* no serían útiles para evaluar relaciones filogenéticas entre cepas de *Frankia*, ya que se observa importante variabilidad intragrupo como entre grupos de cepas. Hasta ahora, el mejor marcador para estudiar filogenia en *Frankia* es la secuencia del rDNA 16S ya que posee regiones conservadas que permiten establecer agrupaciones taxonómicas mayores y regiones más variables para discriminar clados entre cepas dentro del género *Frankia*. Es así como mediante la utilización de la secuencia parcial del 16S rDNA se pudo demostrar que cepas de *Frankia* presentes en nódulos radiculares de *Gymnostoma* también estaban filogenéticamente relacionadas con las cepas infectivas de *Elaeagnus*, pero que los espaciadores intergénicos de la región *nifD-nifK*

eran diferentes en todas las cepas analizadas apoyando la mayor variabilidad de esta región genómica (Navarro *et al.*, 1997).

La diferente topología de los dendrogramas obtenidos con los marcadores RAPDs y PCR-RFLP podría explicarse por el distinto grado de resolución de los marcadores genéticos utilizados. La amplificación al azar del genoma produce patrones muy polimorficos entre las cepas, con sólo algunas bandas en común. Por lo tanto, el grado de similitud entre las cepas es bajo y eso se observa en el dendrograma que no agrupa las cepas en relación a su hospedero, origen o filogenia previamente establecida (Clawson *et al.*, 1998). Sin embargo, es un marcador muy útil para su identificación ya que cada cepa presenta un patrón único de bandas.

En el caso de los marcadores PCR-RFLP son menos variables que los marcadores RAPDs y pueden, en algunos casos, dar agrupamientos que se correlacionen con alguna otra característica de las cepas, como por ejemplo con el tipo de planta que infectan. Así, PCR-RFLP de la región *nifD-nifK* muestra un agrupamiento de las cepas derivadas de Rhamnáceas con un coeficiente de similitud ≥ 0.5 , con sólo dos cepas (ChI7 y ReI6) que se separan del cluster principal.

Un Agrupamiento similar se observó con los marcadores PCR-RFLP de la región IGS 16S-23S rDNA, la mayoría de las cepas de *Frankia* forman un cluster con un nodo correspondiente a un coeficiente de similitud > 0.6 con algunas excepciones como ChI1, ChI4, ChI7 y Ds12.

En síntesis, los dos marcadores usados, tanto RAPDs como PCR-RFLP, identifican cepas estrechamente emparentadas donde es esperable una alta homogeneidad genética. Los RAPDs resultan ser mucho más informativos que otros marcadores moleculares, ya que no están limitados a regiones codificantes como ocurre con el análisis enzimático multilocus y tienen una distribución al azar a lo largo del genoma.

Por su parte, los marcadores PCR-RFLP han sido exitosamente usados para acceder a la diversidad genética entre especies bacterianas tales como *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 1994), *Ralstonia* (Poussier *et al.*, 1999); *Pseudomonas* (Manceau *et al.*, 1997) entre otras. Estos marcadores son fáciles de analizar y tienen alta reproducibilidad. Los RFLP son el resultado de rearrreglos genómicos tales como inserciones y deleciones o mutaciones de punto. Por estas razones los RFLP asociados a regiones intergénicas se espera que exhiban un mayor polimorfismo que las regiones codificantes, las cuales tienen una mayor restricción funcional.

RANGO DE HUÉSPED

Frankia ha sido definida como un simbiote bastante promiscuo, en comparación con la asociación *Rhizobium*-Leguminosa, ya que tiene la capacidad de infectar no solamente su huésped original sino que también puede establecer relaciones simbióticas efectivas con plantas de diferentes géneros y familias. Es así como se han definido los 4 grupos de infectividad (HSG): HSG 1, cepas que infectan *Alnus* y *Myrica*; HSG 2, cepas que infectan diferentes géneros de la familia Casuarinacea; HSG3, que infectan

diferentes géneros de Elaeagnaceae y algunos de Casuarinaceae; (Baker, 1987; Baker y Mullin, 1992). Como podemos ver las cepas que infectan Rhamnaceae no están incluidas entre los diferentes grupos de infectividad hasta ahora definidos, la principal causa ha sido la falta de cultivos puros del simbionte de esta familia de plantas actinorrhizas.

En la literatura hay reportes que incluyen cepas de *Frankia* aisladas desde las rhamnaceas *Colletia espinossisima* (Gauthier *et al.*, 1984) y *Colletia cruciata* (Baker, 1987) que fueron capaces de nodular dos especies de Elaeagnaceae.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las cepas de Rhamnáceas además de infectar plantas de esta misma familia, en este caso *T. trinervis*, también pueden infectar la especie *E. angustifolia* de la familia Elaeagnaceae. A partir de los datos obtenidos podemos proponer que las cepas de *Frankia* aisladas desde Rhamnaceae pertenecen al grupo de infectividad 3 que incluye además las cepas aisladas desde plantas de la familia Elaeagnaceae, como describió previamente Baker (1987). Por otra parte los resultados obtenidos son congruentes con los antecedentes filogenéticos que agrupan a las cepas *Frankia* derivadas de Rhamanceae y Elaeagnaceae en un cluster que se obtuvo utilizando la secuencia de rDNA de 16S en el cual, a excepción de los microsimbiontes de *Ceanothus*, se evidencia la asociación que existe entre los simbiontes de estas dos familias (Clawson *et al.*, 1998).

La actual filogenia molecular basada en la secuencia del DNA ribosomal de 16S (Clawson *et al.*, 1998) y en el gen *nifH* de la nitrogenasa (Jeong *et al.*, 1999) identifican tres principales clados de *Frankia* infectivas. Un cuarto clado agrupa las cepas de *Frankia* no-infectivas y no fijadoras de nitrógeno que han sido detectadas en

nódulos de plantas de casi todas las familias actinorrícicas (Normand *et al.*, 1996). Las cepas infectivas se agrupan en el clado I o grupo *Alnus*, un amplio grupo de cepas que infectan especies de Betulaceae, Casuarinaceae y Myricaceae; clado II o grupo *Elaeagnus* que comprende microsimbiontes de Elaeagnaceae y Rhamnaceae; y el clado III o grupo *Dryas* que agrupa cepas que infectan Rosaceae, Coriariaceae, Datisceae y el género *Ceanothus* (Rhamnaceae). Estos grupos corresponden a los principales clusters del género *Frankia* descrito previamente por Norman *et al.*, (1996).

Los ensayos de inoculación cruzada también revelan la presencia de cepas más promiscuas como Chi4, la cual es capaz de infectar plantas pertenecientes a tres familias actinorrícicas: Rhamnaceae, Elaeagnaceae y Betulaceae. Estas cepas han sido denominadas "flexibles" ya que son capaces de traspasar las barreras entre familias de plantas. Cepas con igual comportamiento en su capacidad de infección han sido previamente descritas, las cuales inducen nodulación en plantas de los géneros *Elaeagnus* y *Alnus* (Bosco *et al.*, 1992). En contraste, algunos aislados de *Casuariana* tales como Ce12, DII y G2 no infectan su planta hospedera original pero nodulan especies de *Elaeagnus* (Torrey y Raccette 1989).

La infectividad de las cepas depende tanto del microsimbionte como de la planta hospedera. Los ensayos de inoculación cruzada también revelan que hay especies vegetales que son promiscuas como ocurre con algunas especies de *Myrica* y *Gymnostoma* las cuales son noduladas por la mayoría de las cepas estudiadas y los microsimbiontes presentes en sus nódulos son altamente diversos (Benson y Clawson 2000; Clawson y Benson 1999). Por el contrario las especies de *Allocasuarina* parecen

ser muy específicas en su interacción con *Frankia* ya que son noduladas por una pocas cepas (Benson y Clawson, 2000; Maggia y Bousquet, 1994).

Al respecto fue importante considerar el hecho que a pesar que las cepas de Rhamnaceae se aislaron de diferentes géneros (ver tabla 1), ellas fueron probadas en el ensayo de inoculación contra *T. trinervis* para probar infectividad en Rhamnaceae. La elección de la planta hospedera se realizó en base a antecedentes reportados previamente por Carú y Cabello (1999) que muestran que las cepas de *Frankia* son infectivas en al menos cuatro géneros de Rhamnaceae (*Colletia*, *Trevoa*, *Retanilla* y *Talguenea*). Por lo tanto cualquier especie actinorrícica de estos géneros sería un hospedero adecuado para realizar estas pruebas de infectividad. Así nuestros datos muestran que todas infectaron *T. trinervis*, y no hay diferencias con las 2 cepas aisladas de este mismo género TtI11 y TtI42 como lo muestra la tabla 8.

En los ensayos de inoculación cruzada también se utilizaron como control positivo especies de los géneros *Casuariana*, *Elaeagnus* y *Alnus* con cepas derivadas de estas plantas actinorrícicas. Estos controles permitirían validar los ensayos de infección y descartar la posibilidad de falsos negativos sobre las especies vegetales de estos géneros. Por lo tanto podemos afirmar que las cepas de *Frankia* no son infectivas en *Casuarina cunninghamina*, ni en *Alnus glutinosa* con excepción de la cepa ChI4.

Hay que hacer énfasis también en el hecho de que los resultados obtenidos en cuanto al rango de huésped de cepas de Rhamnaceae que infectaron preferencialmente solo plantas de esta misma familia y *Elaeagnus*, dan cuenta sólo de lo que pasa a nivel de laboratorio. Tal vez lo que suceda en el campo sea muy diferente ya que existen varios aspectos que podrían influenciar en los resultados finales. Es el caso de la

competencia entre cepas, puede ser que existan cepas más "hábiles" que otras para llevar a cabo el proceso de infección. También puede haber diferencias a nivel de la planta, es decir, en nuestro caso trabajamos con plantas genéticamente heterogéneas y la asociación simbiótica depende tanto de la bacteria como de la planta. Por lo tanto las diferencias observadas entre los porcentajes de nodulación no son exclusivamente debidas al componente microbiano de la simbiosis.

INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD

Después de evaluar el rango de huésped de las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamanceas fue importante determinar la magnitud de la nodulación o infectividad (Nº de nódulos y biomasa nodular) y la eficiencia de la simbiosis o efectividad (actividad de nitrogenasa y nitrógeno total). La infectividad y la efectividad son procesos que dependen tanto del microorganismo como también de la planta.

Los resultados de los experimentos indican que las diferentes cepas aisladas de Rhamnáceas son infectivas sobre *T. trinervis* y *E. umbellata*.

En la tabla 9 vemos que el peso seco de los nódulos producidos por las diferentes cepas en *T. trinervis* es variable, esto está muy relacionado con el tamaño de los mismos, mas no con la actividad enzimática de la nitrogenasa. La tabla 9 ilustra mejor esta conclusión. Si vemos por ejemplo la actividad enzimática de la cepa T111, $14.1 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ peso seco nódulo, es uno de los valores más altos de la tabla, pero si revisamos los valores del peso seco de los nódulos, estos presentan una reducida biomasa. De acuerdo a los resultados obtenidos en estas dos mediciones podemos

sugerir que el desarrollo nodular no tiene una relación directa con la actividad enzimática. El crecimiento y desarrollo del nódulo no solo depende de la cepa microbiana sino que también está influenciado por los niveles alterados de fitohormonas en la región del tejido radicular infectado como por ejemplo las citoquininas (Baker y Mullin, 1992).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de efectividad de las cepas sobre *T. trinervis*, (tabla 9), encontramos que existen diferencias entre las cepas en cuanto a su capacidad de inducir la formación de nódulos. Así tenemos que la TtI42 fue la que produjo más nódulos, lo que es esperable ya que esta cepa es aislada de este mismo género de planta, pero no se ve un resultado similar con la cepa TtI11 también aislada de *T. trinervis*. Estas variaciones ya han sido descritas en estudios realizados con *Retanilla ephedra* en los que se mostró que las cepas aisladas de este género produjeron menos nódulos que los producidos por otra cepa aislada del género *Colletia* (Carú 1999).

En inoculaciones realizadas sobre *Alnus acuminata* también se observó variación de la actividad enzimática inducida por dos cepas aisladas del mismo género (Carú, 2000). Es así como diferentes especies de plantas dentro de un mismo género, diferentes ecotipos, o clones de la misma planta huésped pueden responder de diferente manera a la infección por una determinada cepa de *Frankia* (Benson y Silvester, 1993).

En relación a la efectividad, encontramos que las cepas aisladas de *T. trinervis*, TtI11 y TtI42, mostraron una mayor actividad enzimática, probablemente como consecuencia que se aislaron desde la misma planta hospedera y por lo tanto podrían estar mejor adaptadas a esta asociación específica. Numerosos factores tanto genéticos como ambientales afectan las relaciones planta-microorganismo y han sido descritos en

otras asociaciones simbióticas como *Rhizobium*- leguminosas (Dénarie, 1996). Sin embargo en la simbiosis actinorrícica estos son desconocidos. Por ejemplo, hasta ahora no se han descrito los genes responsables de la nodulación del tipo "nod" de *Rhizobium spp.*

La importancia de la planta huésped en el establecimiento de la simbiosis se puede observar al comparar los valores de actividad de nitrogenasa obtenidos con una cepa cuando ésta infecta diferentes plantas huésped (tabla 9 y 10) Así, las mismas cepas de *Frankia* muestran una simbiosis más efectiva con *E. angustifolia* que con *T. trinervis*. Igualmente la biomasa nodular y número de nódulos por planta es mayor con *E. angustifolia*. Dobritza (1992) reportó la presencia de un mecanismo en *Hippophae rhamnoides*, que suprime la formación de nódulos en exceso. De esta manera la planta evalúa que tan efectiva esta siendo la simbiosis a medida que se va desarrollando el proceso de nodulación, es decir, si la simbiosis es muy efectiva con nódulos pequeños la planta no gastaría más energía aumentando su división celular a nivel de la raíz induciendo nuevos nódulos.

EFFECTO DE LA NODULACION SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA

La inoculación de plantas de vivero con cepas de *Frankia* tuvo efectos positivos sobre el desarrollo de planta ya que se observó incremento en los la altura del tallo, peso seco, diámetro del tallo a la altura del cuello y nitrógeno total para las cuatro especies vegetales ensayadas.

Parámetros como el peso seco muestra que la inoculación en algunos casos puede llegar a duplicar la biomasa de la planta nodulada comparada con el control, por ejemplo en *Trevoa trinervis* las cepas TtI42 y EuIb (tabla 13) promueve el desarrollo de plantas vigorosas. El diámetro del cuello por su parte también refleja el vigor de la planta debido a que se encuentra asociado al grado de lignificación de ellas. Así en general las plantas noduladas incrementan el diámetro del cuello de *Trevoa trinervis* (tabla 13) entre 23-67% estando entre las más vigorosas aquellas noduladas por Tq20 y EuIb. Una respuesta aún mas notoria ocurre con *Elaeagnus angustifolia*, planta en la cual el efecto de nodulación produce un aumento de 2,5 veces el diámetro del cuello cuando está nodulada con EuIb o TtI42. Asimismo el nitrógeno total de las plantas noduladas es mayor que en el control no inoculado, para la mayoría de los pares simbióticos *Frankia*-planta ensayados. El contenido de nitrógeno total es una medida más directa de la efectividad de la simbiosis, ya que las plantas obtienen principalmente el nitrógeno vía simbiosis porque fueron crecidas en ayuno de nitrógeno. El nitrógeno presente en los controles representa el nitrógeno inicial aplicado previo a la germinación y el nitrógeno residual presente en el sustrato.

Resultados previos obtenidos por Carú y Cabello (1999) muestran que plantas de *R. ephedra* (Rhamnaceae) inoculadas con cepas de *Frankia* nativas tuvieron un desarrollo superior al de plantas controles, tanto en altura, peso seco, diámetro del cuello y largo de las raíces, lo que concuerda con los datos obtenidos en esta tesis.

Los datos muestran que los mejores resultados para desarrollo de la planta se obtuvieron con *T. trinervis* nodulada por Tq20, TtI11 y EuIb y con *E. angustifolia* inoculada con DtI1, TtI11, TtI42 y EuIb. Para el caso de *A. glutinosa* se observa un

efecto menor por la nodulación comparada con el control, en particular la cepa ChI4 no produce un efecto significativo en el peso seco, diámetro del cuello y nitrógeno foliar. Probablemente, por tratarse el *A. glutinosa* una especie forestal de mayor envergadura, el tiempo de crecimiento de la planta no es suficiente para observar diferencias significativas entre las plantas noduladas y controles.

En algunos casos el efecto de la nodulación altura y peso seco de la planta es casi nulo como ocurre con *E. angustifolia* nodulada por Tq15 y Tq20 (tabla 14). Por el contrario hay cepas que tienen un importante efecto en el crecimiento de la planta. Esto sugiere que hay asociaciones simbióticas más exitosas que otras cuando existe promiscuidad en el simbionte. Este aspecto es muy relevante cuando se proponen estrategias de utilización de la simbiosis actinorríca con propósito de reforestación, ya que se deben determinar los pares simbióticos (cepa-planta) más adecuados. Gauthier (1999) propuso utilizar *Frankia* aislada de *Gymnostoma* para ser inoculada en *Casuarina collina* como huésped alternativo en hábitats donde no se encuentre *Gymnostoma* o cuando las condiciones ecológicas sean mas favorables para *C. collina*.

Por otro lado Steele *et al.*, 1989, recomiendan escoger cepas que tengan los tiempos de crecimiento más cortos. Es así como ellos encontraron que la optimización de las condiciones de crecimiento de cada una de las cepas debería aumentar la actividad simbiótica. Sus resultados mostraron que la altura de los rebrotes de plantas inoculadas era el doble de aquellas no inoculadas y que su peso era también 10 veces más que los respectivos controles.

PERSPECTIVAS

A pesar de que el diseño experimental no nos permite valorar cambios importantes en las plantas como efecto de la inoculación con *Frankia* debido a que son plantas que tienen crecimiento lento y su desarrollo total no puede medirse a los 7 meses de edad, se ha logrado tener una idea del comportamiento de las cepas aisladas de rhamnáceas sobre diferentes plantas huésped. Esto puede dar paso a un análisis más exhaustivo que permita la obtención de pares simbióticos altamente eficientes que puedan ser empleados en programas de reforestación y recuperación de suelos erosionados o pobres en nutrientes.

La disponibilidad de nitrógeno combinado en el suelo mediante fijación biológica es importante para la fertilidad y sustentabilidad del suelo. Comparado con el fertilizante químico, la fijación simbiótica de nitrógeno es una alternativa para el desarrollo de inoculante biológico. Lo cual es relevante en términos económicos y de seguridad ambiental, ya que los primeros son importantes fuentes de contaminación. En tal sentido la simbiosis actinorrhiza adquiere importancia ecológica en la rehabilitación de suelo y puede tener valor económico en la nodulación en vivero de especies de importancia forestal.

CONCLUSIONES

- 1.- Los marcadores moleculares RAPDs y RFLP permiten detectar la diversidad genética entre cepas estrechamente relacionadas, como es el caso de cepas de *Frankia* que infectan a una misma familia de plantas hospederas.
- 2.- Las regiones intergénicas de los genes *nifD-nifK* y las regiones intergénicas de los genes ribosomales 16S y 23S muestran suficiente variabilidad entre las cepas de *Frankia* derivadas de plantas de diferentes familias actinorrícicas como a nivel de diferentes géneros de una misma familia actinorrícica, por Ej: Rhamnaceae.
- 3.- La especificidad de huésped de las cepas de *Frankia* aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae permite asignarlas en su mayoría al grupo Elaeagnaceae-Rhamnaceae.
- 4.- Hay al menos una cepa, ChI4 que tiene un mayor rango de hospedero, siendo una cepa más "flexible" en el establecimiento de la simbiosis, la cual también es capaz de nodular a *Alnus glutinosa* (Betulaceae).
- 5.- Todas las cepas de *Frankia* estudiadas que derivan de plantas de la familia Rhamnaceae son infectivas y efectivas en la fijación de nitrógeno en simbiosis.
- 6.- Las cepas de *Frankia* estudiadas en los ensayos de inoculación afectan positivamente el crecimiento y desarrollo de la planta que son capaces de nodular.

APENDICE 1

Buffer TENC

Tris-HCl 100 mM

EDTA 20 mM pH 9.5

NaCl 1.4M

CTAB 2% w/v.

Gel de acrilamida 8% (50ml)

Acril-Bisacrilamida 40%	10 ml
TBE 5X	10 ml
TEMED	25 μ l
Persulfato de amonio 10%	350 μ l
Agua bidestilada	29,62 ml

TBE 5X (1L)

Tris base	54 g.
Acido bórico	27,5 g.
EDTA 0.5M pH8.0	20 ml

TAE 50X (1L)

Tris base	242 g.
Acido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0.5M pH8.0	100 ml

Medio BAP(1L)

Glucosa	10 g.
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,05 g.
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,01 g.
FeEDTA	0,01 g.
NH ₄ Cl	0,267 g.
Solución micronutrientes	1 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Buffer fosfato 10mM	10 ml

Solución de micronutrientes (1L)

H ₃ BO ₄	2,86 g.
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81 g.
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,22 g.
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,08 g.
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,025 g.
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,001 g.

Solución de vitaminas (100ml)

Hidroclorhidrato de tiamina	10 mg.
Hidroclorhidrato de piridoxina	50 mg.
Acido nicotínico	50 mg.
Biotina	22.5 mg.
Acido fólico	10 mg.
Riboflavina	10 mg.

Solución Hoagland

Stock	Con N (lt)	Sin N
micronutrientes (BAP)	1 ml	1 ml
Fe DTA 0.02M	1 ml	1 ml
1M KNO ₃ 1M	5 ml	0
1M MgSO ₄ .7H ₂ O 1M	2 ml	2 ml
1M KH ₂ PO ₄ 1M	1 ml	1 ml
1M CaCl ₂ .2H ₂ O 1M	0	5 ml
1M KCl 1M	0	5 ml
1M Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O 1M	5 ml	0

BIBLIOGRAFIA

- An, C.S., Riggsby, W.S., and Mullin, B.C. 1985. Restriction pattern analysis of genomic DNA of *Frankia* isolates. *Plant Soil* 87: 43-48.
- An, C.S., Wills, J.H., Riggsby, W.S., and Mullin, B.C. 1983. Deoxiribonucleic acid base composition of 12 *Frankia* isolates. *Can. J. Bot.* 61:2859-286
- Baker, D.D. 1987. Relationships among pure cultured strains *Frankia* on host specificity. *Physiol. Plantarum* 70: 245-248.
- Baker, D.D., and Mullin, B.C. 1992. Actinorhizal Symbioses. pp. 259-292. In Stacey, G., Burris, R.H., and Evans, H.J.Ed., Biological nitrogen fixation. Routledge, Chapman and Hall, Inc. USA.
- Baker, D.D., Pengelly, W., and Torrey, J.G. 1981. Immunological analysis of relationships among the isolated Frankiae (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 148-151.
- Benson, D.R., Buchholz, S.E., and Hanna, D.G. 1984. Identification of *Frankia* strains by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 489-494s.
- Benson, D.R., and D.G. Hanna. 1983. *Frankia* diversity in an alder stand as estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins. *Can. J. Bot.* 61:2919-2923.
- Benson, D.R., and Clawson, M.L. 2000. Evolution of the actinorhizal plant symbiosis. pp. 207-224, in E.W. Triplett ed., Prokariotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Benson, D., and Silvester, W. 1993. Biology of *Frankia* strains, Actinomycete symbionts of Actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 292-319.
- Benson, D., Stephens, D.W., Clawson, M.L., and Silvester, W.B. 1996. Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou* and *Purshia tridentata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2904-2909.

- Berry, A., and Sunell, L.A. 1990. The infection process and nodule development, pp. 61-81, in C.R. Schwintzer and J.D. Tjepkema, eds., *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic Press, San Diego, California.
- Beyazova, M., and Lechevalier, M.P. 1992. Low-frequency restriction fragment analysis of *Frankia* strains (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 422-433.
- Bloom, R.A., Mullin, B.C., and Tate, R.L. 1989. DNA restriction patterns and DNA-DNA solution hybridization studies of *Frankia* isolated from *Myrica pensylvanica* (Bayberry). *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2155-2160.
- Bravo, L. 2002. Diversidad genética y especificidad de huésped de las cepas de *Frankia* aisladas de la familia Rhamnaceae. Tesis para optar por el título de Magister en Ciencia Biológicas mención genética. Universidad de Chile.
- Bosco, M., Fernandez, M.P., Simonet, P., Materassi, R., and Normand, P. 1992. Evidence that some *Frankia* spp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1569-1576
- Callaham, D., P. Del Tredecí, and J. G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199: 899-902.
- Carrasco, A., Schwenke, J., and Carú, M. 1992. Isolation of *Frankia* from nodules of *Trevoa trinervis*: ultrastructural characterization. *Can. J. Microbiol.* 38:174-180.
- Carú, M. 1993. Characterization of native *Frankia* strains isolated from Chilean shrubs (Rhamnaceae). *Plant Soil* 157:137-145.
- Carú, M. 1995. Sporulation of two *Frankia* strains in submerged cultures. *Acta Microbiol.* 6: 145- 151.
- Carú, M., Abarzúa, M., and Carrasco, A. 1990. Estructura fina de *Frankia*, cepas ChI1 y ChI2 aisladas de *Colletia hystrix* (Clos). *Acta Microbiol.* 3: 55-62.
- Carú, M., and Cabello, A. 1999. Infectivity and effectivity of some *Frankia* strains from Rhamnaceae family. *Arid Soil Rehabilit.* 13: 53-59.
- Carú, M., A. Becerra, D. Sepúlveda, and A. Cabello. 2000. Isolation of infective and effective *Frankia* strains from root nodules of *Alnus acuminata* (Betulaceae). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:647-651.
- Cérémonie, H., B.Cournoyer, F.Maillet, and P.Normand. 1998. Genetic complementation of rhizobial nod mutants with *Frankia* DNA: artifact or reality?. *Mol. Gen. Genet.* 260:115-119.

- Chen, L., Y. Chui, M. Qin, Y. Wang, X. Bai, and Q. Ma. 1991. Identification of *nodD*-like gene in *Frankia* by direct complementation of a *Rhizobium nodD*-mutant. *Mol. Gen. Genet.* 233:311-314.
- Clawson, M.L., and Benson, D.R. 1999. Natural diversity of *Frankia* strains in actinorhizal root nodules from promiscuous host in the family Myricaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4521-4527.
- Clawson, M.L., Carú, M., and Benson, D.R. 1998. Diversity of *Frankia* strains in root nodules of plants from the families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3539-3543.
- Cournoyer, B., Gouy, M., and Normand, P. 1993. Molecular phylogeny of the symbiotic actinomycetes of genus *Frankia* matches host-plant infection process. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1303-1316
- Dawson, J.O. 1986. Actinorhizal plants: their use in forestry and agriculture. *Outlook Agricult.* 15: 202-207.
- Dawson, J.O. 1990. Interactions among actinorhizal and associated plant species pp. 299-316 in C.R. Schwintzer, and J.D. Tjepkema, eds., *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press, Inc. California.
- Dénarie, J., and Debelle, F. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factor: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65:503-535.
- Dobritza, S.V., and Novik, S.N. 1992. Feedback regulation of nodule formation in *Hippophaë rhamnoides*. *Plant Soil* 144:45-50.
- Gardes, M., Busquet, J., and Lalonde, M. 1987. Isoenzyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1596-1603.
- Gauthier, D., Frioni, L., Diem, H.G., and Dommergues, Y. 1984. The *Colletia spinosissima*-*Frankia* symbiosis. *Acta Ecol.* 5: 231-239.
- Gauthier, D., E. Navarro, G. Rinaudo, P. Jourand, T. Jaffré, and Y. Prin. 1999. Isolation, characterisation (PCR-RFLP) and specificity of *Frankia* from eight *Gymnostoma* species endemic to New Caledonia. *European J. Soil Biol.* 35:199-205.
- Girgis, M.G.Z. and J. Schwencke. 1993. Differentiation of *Frankia* by their electrophoretic patterns of intracellular esterases and aminopeptidases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2225-2232.

- Harriot, O.T., Th.J. Hosted, and R.D. Benson. 1995. Sequences of *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB* and two ORF in the *Frankia* nitrogen fixation gene cluster. *Gene* 191:63-67.
- Haukka, K., Lindstrom, K., and Young, J.P. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:419-426.
- Hirsch, A.M., McKhann, H.I., Reddy, A., Liao, J., Fang, Y., Marshall, C.R. 1995. Assessing horizontal transfer of *nifHDK* genes in Eubacteria: Nucleotide sequence of *nifK* from *Frankia* strain HFPCc13. *Mol. Biol. and Evol.* 12:16-27.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, California. University of California, Agricultural Experimental Station. Circular 347.
- Igual, J.M., Velázquez, E., Mateos, P., Rodriguez-Barrueco, C., Cervantes, E., and Matínez-Molina, E. 2001. Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups. *Plant and Soil* 229: 35-39.
- Jamann, S., Fernández, M.P., and Moiroud, A. 1992. Genetic diversity of Elaeagnaceae-infective *Frankia* strains isolated from various soils. *Acta Ecol.* 13:395-405.
- Jamann, S., Fernandez, M., and Normand, P. 1993. Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol. Ecol.* 2:17-26.
- Jeong, S.C., and Myrold, D.D. 1999. Genomics fingerprinting of *Frankia* microsymbionts from *Ceanothus* copopulations using repetitive sequences and polymerase chain reactions. *Can. J. Bot.* 77: 1220-1230.
- Jeong, S.C., N.J. Ritchie, and D. D. Myrold. 1999. Molecular Phylogenies of Plants and *Frankia* Support Multiple Origins of Actinorhizal Symbioses. *Mol. Phyl. Evol.* 13:493-503.
- Kim, H.B., and C.S. An. 1997. Nucleotide sequence and expression of *nifHD* from *Frankia* strain EuK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. *Physiologia Plantarum* 99: 690-695.
- Laguerre, G., Allard, M.R., Revoy, F., and Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M-R., Charnay, M-P., Louvrier, P., Mazurier, S-I., Rigottier-Gois, L., and Amarger, N. 1996. Typing of *rhizobia* by PCR DNA fingerprinting

and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2029-2036.

Lechevalier, M.P. 1994. Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 1-8.

Lin, A., Usera, M., Barrett, T., and Goldsby, R. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34 :870-876.

Liu, Q., and A.M. Berry. 1991. The infection process and nodule initiation in the *Frankia-Ceanothus* root nodule symbiosis. *Protoplasma* 163: 82-92.

Lumini, E., and Bosco, M. 1996a. PCR-Restriction Length Polymorphism identification and host range of single-spore isolates of the flexible *Frankia* sp. strain UFI 132715. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3026-3029

Lumini, E., Bosco, M., Fernandez, M. 1996b. PCR-RFLP and total DNA homology revealed three related genomic species among broad-host-range *Frankia* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21:303-311.

Maggia, L., and Bousquet, J. 1994. Molecular phylogeny of the actinorhizal Hamamelidae and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Mol. Ecol.* 3:459-467.

Maggia, L., Nazaret, S., and Simonet, P. 1992. Molecular characterization of *Frankia* isolates from *Casuarina equisetifolia* root nodules harvest in West Africa (Senegal and Gambia). *Acta ecol.* 13:453-461.

Manceau, C., and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. Tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 498-505.

Mc Ewan, N.R., C.T. Wheeler, and J. J. Milner. 1994. Strain discrimination of cultured and symbiotic *Frankia* by RFLP-PCR. *Soil Biol. Biochem.* 26: 541-545.

Megnégneau, B., Debets, F., and Hoekstra, R. 1993. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergillus* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Gen.* 23:323-329.

Midgley, S.J., Turnbull, J.W., and Johnston, R.D. (eds) 1983. *Casuarina Ecology Management and Utilization*. Common. Sci. Ind. Res. Org (SCIRO), Melbourne, Australia.

- Miller, I.M., and D.D. Baker. 1986. Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. *Protoplasma* 131: 82-91.
- Mirza, M.S., J.D. Janse, D. Hahn, and A.D.L. Akkermans. 1991. Identification of atypical *Frankia* strains by fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Letter* 83: 91-98.
- Mirza, M.S., W.M Akkermans, and A.D.L. Akkermans. 1994a. PCR-amplified 16S rRNA sequence analysis to confirm nodulation of *Datisca cannabina* L. by the endophyte of *Coriaria nepalensis* Wall. *Plant and Soil* 160: 147-152.
- Mirza, M.S., D. Hahn, S.V. Dobritsa, and A.D.L. Akkermans. 1994b. Phylogenetic studies on uncultured *Frankia* populations in nodules of *Datisca cannabina*. *Can. J. Microbiol.* 40: 313-318.
- Murry, M.A., A.S. Konopka, S.D. Pratt, and T.L. Vandergon. 1997. The use of PCR-based typing methods to assess the diversity of *Frankia* nodule endophytes of actinorhizal shrub *Ceanothus*. *Physiologia Plantarum*. 99: 714-721.
- Murry, M.A., Fontaine, M.S., and Torrey, J.G. 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp HFP Ar13 grown in batch culture. *Plant and Soil* 78: 61-78.
- Nalin, R., Domenach, AM., and Normand, P. 1995. Molecular structure of the *Frankia* spp. *nifD-K* intergenic spacer and design of *Frankia* genus compatible primer. *Mol. Ecol.* 4:483-491.
- Navarro, E., R. Nalin, D. Gauthier, and P. Normand 1997. The nodular microsymbionts of *Gymnostoma* spp. are *Elaeagnus*-infective *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1610-1616.
- Nazaret, S., Cournoye, B., Normand, P., and Simonet, P. 1991. Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J. Bacteriol.* 173: 4072-4078.
- Nazaret, S., Simonet, P., Normand, P., and Bardin, R. 1989. Genetic diversity among *Frankia* isolated from *Casuarina* nodules. *Plant Soil* 118: 241-247.
- Newcomb, W., and S.M. Wood. 1987. Morphogenesis and structure of *Frankia* (Actinomycetales): the microsymbiont of nitrogen fixing actinorhizal root nodules. *Int. Rev. Cytol.* 109: 1-88.
- Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushenko, L., and Misra, AK. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family Frankiaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1-9.

Normand, P., Simonet, P., and Bardin, R. 1988. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Molecular and Gen. Genet.* 213: 238-246.

Olive, D. Michael, and Bean, Pamela. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1661-1669.

Pawlowski & Biseling 1996. Rhizobial and Actinorhizal symbioses: What are the shared features? *The Plant Cell* 8: 1899-1913

Pérez, O., Olivera, H., Vásquez, L., and Valdès, M. 1999. Genetic characterization of Mexican *Frankia* strains nodulating *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Bot.* 77: 1214-1219

Postgate, J.R. 1982. In *Methods in Microbiology* Eds. J.R. Morns And D.W. Ribbons. Vol28, 343-356. Academic press Inc. London.

Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2184-219

Ritchie, N.J., and D.D. Myrold. 1999. Geographic distribution and genetic diversity of *Ceanothus*-infective *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1378-1383.

Rohlf, F.J. 1994. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Syst, Version 2.0. New York: Exeter Software.

Rosado, A., Duarte, G., Seldin, L., and Van Elsas, J.D. 1998. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strain and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2770-2779.

Rouvier, C., Nazaret, S., Fernandez, M., Picard, B., Simonet, P., and Normand, P. 1992. *rrn* or *nif* intergenic spacers and isoenzyme patterns a tool to characterize *Casuarina* infective *Frankia* strains. *Acta Ecol.* 13, 4.

Rouvier, C., Prin, Y., Reddell, P., Normand, P., and Simonet, P. 1996. Genetic diversity among *Frankia* strains nodulating members of family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and Restriction Length Polymorphism analysis with crushed root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:979-985.

Ruan, J.S., and Wang, C. 1991. Nutritional physiology of Frankiae. *Actinomycetes* 2: 77-80.

Rundel, P.W., and J.W. Neel. 1978. Nitrogen fixation by *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) in the Chilean matorral. *Flora* 167: 127-132.

Schwencke, J. 1994. *Frankia* strains from the Casuarinaceae family. Identification by their zymograms of esterases and antibiotic sensitivity. possibilities and limitations, pp 567-576 in N.A.Hegazi, M. Fayez, and M. Monib eds., Nitrogen fixation with non-legumes. The American University of Cairo Press, Egypt.

Sellstedt, A., Wullings, B., Nyström, U., and Gustafsson, P. 1992. Identification of *Casuarina-Frankia* strains by use of polymerase chain reaction (PCR) with arbitrary primers. *Microbiol. Lett.* 93 : 1-6.

Silvester, W. B., O. Balboa and J.A.Martinez. 1985. Nodulation and nitrogen fixation in members of the Rhamnaceae (*Colletia*, *Retanilla*, *Talguenea*, *Trevoa*) growing in the Chilean matorral. *Symbiosis* 1:29-38.

Simonet, P., Navarro, E., Rouvier, C., Reddel, P., Zimpfer, J., Dommergues, Y., Bardin, R., Combarro, P., Hamelin, J., Domenach, A-M., Goubière, F., Prin, Y., Dawson, J., and Normand, P. 1999. Co-evolution between *Frankia* populations and host plants in the family Casuarinaceae and consequent patterns of global dispersal. *Environ. Microbiol.* 1:525-535.

Steele, D.B., K. Ramirez, and M.D. Stowers. 1989 Host plant growth response to inoculation with *Frankia*. *Plant and Soil* 118: 139- 143.

Steffan, P., Vazquez, J.A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D., and Akins, R. 1997. Identification of *Candida* species by Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J. Clin. Microbiol.* 35:2031-2039

Swensen, S., and Mullin, B. 1997. Phylogenetic relationships among actinorhizal plants. The impact of molecular systematics and implications for the evolution of actinorhizal symbioses. *Physiol. Plant.* 99:565-573.

Torrey, J.G., and Racette, S. 1989. Specificity among the Casuarinaceae in root nodulation by *Frankia*. *Plant and Soil* 118:157-164.

Vandame, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to bacterial Systematics. *Microbiological Rev.* 60: 407-438

van Ghelue, M., E. Lovaas, E. Ringo, and B. Solheim. 1997. Early interaction between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiologia Plantarum* 99: 579-587.

Wang, G., Whittam, T.S., Berg, C.M., and Berg, D.E. 1993. RAPD (arbitrary primer) is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucl. Acid Res.* 21: 5930-5933.

Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.* 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, N.R., Livak, K. J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* 18: 6531-6535.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

Yoo, et al 1999 - Yoo, W.Y. Sung, S.B. & An, Ch.S. 1999 Nucleotide sequence of the 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase and ferredoxin genes from *Frankia* strains EulK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata* root nodules, *Can. J. Bot.* 77 1279-1286.