

UCH-FC
DOC-Microbiología
CA 499

C-1 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Frankia* Y
DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN LA RIZÓSFERA
DE *Colletia hystrix*.

Tesis

entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

MÓNICA CHÁVEZ VIVAS

Abril 2004

Director de Tesis: Dra. Margarita Carú M

2576006



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Mónica Chávez Vivas

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de abril del 2004.

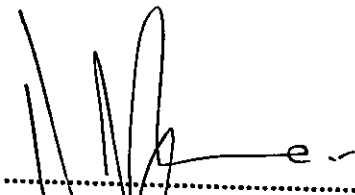
Director de Tesis

Dra. Margarita Carú M.

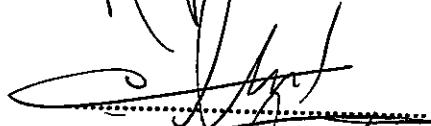


Comisión de Evaluación de la Tesis

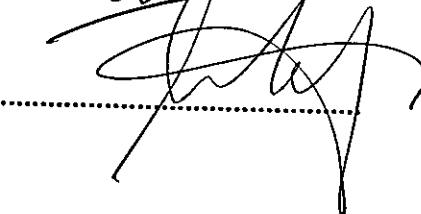
Dr. Romilio Espejo



Dr. Davor Cotorás



Dr. Victor Cifuentes





A mi madre
esposo e
hija

AGRADECIMIENTOS



Deseo expresar mi gratitud a las siguientes instituciones y personas:

a la Universidad de Chile y a los profesores del comité de Doctorado, por los conocimientos que me impartieron durante estos años.

al DAAD, por proporcionarme la beca que me permitió realizar mis estudios.

al Laboratorio de genética por su colaboración en la realización de las secuencias

A los profesores Rosalba Lagos, Victor Cifuentes y Davor Cotorás, por el gran apoyo que me brindaron

a la Dra. Margarita Carú, por la formación que me impartió durante la realización de la tesis, por su comprensión y su incansable asesoramiento.

a mis compañeros de tesis, Mirna Cruz y Marlene Rozas por la amistad y valiosa colaboración en la ejecución de la tesis

a mis compañeros de laboratorio: Rafael Guevara, Barbara Saavedra, Juanita Leal, Lorena Bravo, Pilar, Dony, salvador, Betty, Ana, Julieta y Marco por su amistad, por el asesoramiento, la ayuda incondicional, la agradable atmósfera de trabajo y el gran compañerismo.

a mis amigos, Norma Gonzalez, Lida Mancilla, Alba Lucia Chávez, Claudia Flórez, Nayibe Barreto, Claudia Moreno, Cristina Valencia y Carlos Muskus por toda la ayuda, por su sincera amistad, las palabras de aliento y por estar siempre conmigo.

a Fraxnex Alexis Nieto, mi esposo por su amor, comprensión y su constante apoyo.

a mi madre Paulina y mi hermano, José por sus palabras de aliento y apoyo desde Colombia

a mi hija Laura Andrea por su ternura, inocencia, alegría y su existencia.



INDICE DE MATERIAS

Agradecimientos.....	iv
Indice de Materias.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes generales sobre <i>Frankia</i>	3
1.1 Morfología.....	4
1.2 Taxonomía.....	5
2. Plantas hospederas.....	7
3. Diversidad genética de <i>Frankia</i>	8
3.1 Marcadores moleculares.....	8
3.1.1 operón <i>nif</i>	8
3.1.2 Operón ribosomal.....	9
3.2 Diversidad en las cepas de colección.....	10
3.3 Ecología molecular de las poblaciones naturales de <i>Frankia</i>	11



3.3.1 Cuantificación de cepas de <i>Frankia</i> en el suelo.....	14
3.3.2 Estado microsimbionte.....	15
3.2.3 Estado de vida libre.....	18
3.2.4 Diversidad de los ensamblajes microbianos.....	21
4. <i>Frankia</i> asociada a plantas de la familia Rhamnaceae.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
1. Materiales.....	26
1.1 cepas, nódulos y muestras de suelo.....	26
1.1.1 cepa referencia de <i>Frankia</i>	26
1.1.2 Nódulos y muestras de suelo.....	26
2. Métodos.....	30
2.1 Mantenimiento y cultivo de las cepas.....	30
2.1.1 Cepas de <i>Frankia</i>	30
2.1.2 Cepas de referencia del grupo fijador de nitrógeno.....	30
2.2 Extracción del DNA genómico.....	30
2.2.1 Obtención del DNA de la cepa de <i>Frankia</i> ChI4.....	30
2.2.2 Obtención del DNA de las cepas referencia.....	31
2.2.3 Obtención del DNA a partir de nódulos.....	32
2.2.4 Obtención del DNA a partir de muestras de suelo.....	32
2.2.5 Cuantificación de DNA.....	33



2.3 Análisis de las poblaciones microsimbiontes.....	33
2.3.1 Amplificación por PCR del DNA de los nódulos.....	33
2.3.2 Perfiles RFLP-PCR.....	34
2.3.3 Secuencia parcial de los fragmentos en los IGS <i>rrn</i>	35
2.3.4 Análisis de datos y construcción de dendrogramas.....	36
2.4. Determinación de UGs de <i>K. pneumoniae</i> por el NMP-PCR.....	37
2.4.1 Determinación de las unidades genómicas (UGs) de <i>Frankia</i> por el método del NPM-PCR.....	38
2.5 Generación de los perfiles SSCP.....	39
2.5.1 Secuenciación del fragmento del gen 16S.....	43
2.6 Análisis de los genes <i>nifH</i> mediante predicción de los perfiles T-RFLP.....	43
2.6.1 Obtención de los Perfiles en el gen <i>nifH</i> por T-RFLP.....	44
2.7. Análisis de los perfiles T-RFLP del DNAr 16S.....	47
2.8 Análisis de los perfiles T-RFLP en el gen <i>nifH</i> y DNAr 16S.....	48
2.9 Determinación de los parámetros edáficos.....	49



RESULTADOS.....	52
1. Polimorfismo genético de la población del microsimbionte asociado a <i>Colletia hystrix</i> (<i>Frankia</i> en nódulos).....	52
1.1 Análisis de los grupos RFLP-PCR.....	56
1.2 Diversidad genética del microsimbionte <i>Frankia</i> en un único nódulo.....	59
1.3 Diversidad genética de microsimbiontes de <i>Frankia</i> dentro y entre grupos derivados de plantas diferentes	59
2. Análisis de las poblaciones actinomicetes (<i>Frankia</i> en el suelo).....	70
2.1 Comparación de la técnica de NMP-PCR con métodos convencionales de cuantificación de bacterias.....	70
2.2 Análisis de la diversidad genética de la población actinomicete de <i>Frankia</i> en el suelo	75
3. Análisis de la diversidad genética del gremio fijador de nitrógeno.....	84
3.1 Análisis TRFLP en el gen <i>nifH</i>	84
3.2 Diversidad del gremio fijador de nitrógeno.....	89
4. Análisis de la diversidad genética de la comunidad microbiana.....	89
DISCUSIÓN.....	98
1. Diversidad genética en las poblaciones microsimbiontes de <i>Frankia</i>	98



1.1	Diversidad de microsimbiontes de <i>Frankia</i> dentro de un nódulo.....	100
1.2	Dominancia de un microsimbionte en los nódulos radiculares	101
1.3	Estabilidad de genotipos y distribución de clones.....	102
1.4	Diversidad genotípica de <i>Frankia</i> dentro y entre plantas Hospederas.....	104
1.5	Estructura genética de <i>Frankia</i> en el suelo.....	109
2.	Diversidad genética de de <i>Frankia</i> en el suelo.....	111
2.1	Densidad de la población actinomicete de <i>Frankia</i>	111
2.2	Riqueza genética de la población actinomicete de <i>Frankia</i>	115
3.	Estructura genética del gremio fijador de nitrógeno.....	118
4.	Diversidad genética de la comunidad microbiana total.....	121
	CONCLUSIONES.....	126
	REFERENCIAS.....	128
	ANEXO 1.....	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Célula de una planta infectada con <i>Frankia</i> y tipos de células en <i>Frankia</i>	4
Figura 2. Planta de <i>Colletia hystrix</i> y nódulos actinorrhizales de <i>C. hystrix</i>	23
Figura 3. Mapa del sitio de recolección de las muestras de suelo y nódulos.....	29
Figura 4. Esquema de la determinación de riqueza de genotipos en la población del suelo de <i>Frankia</i> por la técnica del SSCP.....	42
Figura 5. Evaluación de la diversidad genética del pool del <i>nifH</i>	46
Figura 6. Amplificación por PCR de los grupos microsimbiontes	53
Figura 7. Patrones RFLP-PCR.....	55
Figura 8. Alineamiento de las secuencias del haplotipo A3.....	58
Figura 9. Patrones RFLP-PCR en lódulos del mismo nódulo.....	60
Figura 10. Dendrograma basado en los patrones PCR-RFLP que muestra la relación entre individuos.....	63
Figura 11. Dendrograma de relación entre grupos de microsimbiontes.....	66
Figura 12. Distribución espacial y diversidad genética de los haplotipos de los Grupos microsimbiontes.....	68
Figura 13. Comparación del método del NMP-PCR con técnicas convencionales de cuntificación de bacterias.....	72
Figura 14. PCR anidado y cuantificación de la población actinomicete de <i>Frankia</i> por el método del NMP-PCR.....	76

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de 524 pb del DNAr 16S.....	77
Figura 16. Perfiles SSCP del DNAr 16S	77
Figura 17. PCR semi anidado de la región IGS rnm perfiles SSCP.....	80
Figura 18. perfiles SSCP de la región IGS rnm	81
Figura 19. Alineamiento de la secuencia de 537 pb de la región IGS rnm	83
Figura 20. Perfil T-RFLP en el gremio fijador de nitrógeno.....	85
Figura 21. Dendrograma que muestra la relación de las bacterias del gremio fijador de nitrógeno.....	87
Figura 22. Análisis estadístico PCA del gremio fijador de nitrógeno.....	88
Figura 23. Porcentaje de distribución de los TRFs.....	91
Figura 24. Distribución de los TRFs entre los tres sitios de estudio.....	93
Figura 25. Dendrograma de la comunidad microbiana total.....	96
Figura 26. Análisis estadístico PCA en la comunidad microbiana total.....	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cepas de referencia empleadas en la tesis.....	28
Tabla 2. Determinación de micronutrientes.....	51
Tabla 3. Frecuencia de haplotipos PCR-RFLP en cada grupo de microsimbiontes asociada a una planta hospedera	57
Tabla 4. Diversidad genética de los grupos de microsimbiontes de <i>Frankia</i> presentes en <i>C. hystrix</i>	61
Tabla 5. Matriz de distancia genética.....	65
Tabla 6. Haplotipos esperados en la población de microsimbiontes.....	69
Tabla 7. Genotipos SSCP generados por la combinación de los perfiles SSCP.....	82
Tabla 8. Diversidad genética de la comunidad microbiana total.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- BLAST. Basic local alignment search tool.
- BSA. Seroalbúmina bovina
- D.O. Densidad óptica
- dNTP. Desoxiribonucleótido trifosfato
- EDTA. Ácido etilendiaminotetracético
- glnII*. Gen glutamina sintetasa
- HSG. Host Specific Group (Grupos de infectividad o especificidad del hospedero)
- IGS. Espaciador intergénico
- MICA. Microbial community analysis
- NMP. Número más probable
- OTUs. Operational taxonomic units (unidades taxonómicas operacionales)
- PCA. Principal component analysis (Análisis de componentes principales)
- PCR. Polimerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
- PCR-NMP. Número más probable acoplado al PCR
- PHYLIP. Phylogeny Inference Package (paquete de inferencia de filogenia)
- RFLP. Restriction Fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
- rnr*. Operón ribosomal
- SDS. Dodecil sulfato de sodio
- SSCP. single strand conformation polymorphisms (Polimorfismo en la conformación de la simple hebra)

TAE. Tris-ácido acético-EDTA

TBE. Tris-borato-EDTA

TE. Tris-EDTA

T-RFLP. Terminal restriction Fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)

TRFs. Terminal Restriction Fragments (Fragmentos terminales de restricción)

Tris. Tris(hidroximetil)aminoetano

UG. Unidad genómica

UN. Unidad de nodulación

UPGMA. Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Frankia* play a very important role in soil by inducing nitrogen-fixing nodules on the roots of non-leguminous plants named actinorhizal plants. They are a diverse group of trees and shrubs that grow in different habitats. Some actinorhizal plants are a significant component of the matorral in Central Chile, among them *Colletia hystrix* (Rhamnaceae).

The main objective of this thesis was to determine the genetic diversity of uncultured *Frankia* growing in both habitats (nodules and soil) and to evaluate the importance of *Frankia* within the nitrogen-fixing bacterial guild and in the total soil microbial community.

The studied site was located in El Romeral (Cajón del Maipo, Chile). Eighty-eight samples of root nodules from *C. hystrix* and fifteen samples of rhizosphere soil from the same host plants, non-actinorhizal plants and soil without plants were used. RFLP-PCR analysis in the intergenic region IGS *itm* and *nif* was used as a means to estimate molecular diversity of *Frankia* in actinorhizal nodules. A *Hae*III digestion of the PCR product allowed us to identify PCR-RFLP groups or haplotypes among the *Colletia*-infective *Frankia* strains tested. Fifteen haplotypes were recognized on the basis of combining the restriction patterns in each region analyzed. The data showed that the microsymbionts associated to each host plant exhibited unique haplotypes, except the haplotype A3 which was

observed in all the host plants with a high frequency. This haplotype was also exhibited by strain ChI4, isolated in 1991 in the same locality indicating that it is the most common haplotype in this area and very stable over time.

The genetic diversity observed among the microsymbionts is organized in at least three groups which exhibited a major genetic differentiation indicating a spatial heterogeneity in the population. The data also showed that the genetic diversity of these natural populations of *Frankia* is organized in a limited number of clones in a nonrandom association of DNA fingerprinting of both genomic regions, suggesting that the genetic structure of the populations can be considered as clonal.

In the *Frankia* populations of soil, we found a high number of *Frankia* genome units (5.6×10^6 GU/g soil) associated to the rhizosphere of *C. hystrix* and a lower number ($5-6 \times 10^4$ GU/g soil) in soil without plants. However, in the characterization of *Frankia* populations in soil by SSCP analysis, richness observed as a means of estimating total genotype SSCP of *Frankia* was greater in soil than in rhizosphere soil. We found nine SSCP genotypes in all sites, but only one SSCP genotype (G1) was distributed in all the *Frankia* soil populations. This genotype was also exhibited by strain ChI4.

We have also analyzed the variability in bacterial *nifH* and 16S rRNA genes by TRFLP analysis from soil samples and rhizosphere as a means to estimate molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria, and microbial community. We found that each of the three clusters of nitrogen-fixing populations corresponded

to the three habitats studied. While the microbial community evenness and richness was similar in rhizosphere soil of *C. hystrix*.

RESUMEN

Las bacterias del género *Frankia* fijan nitrógeno en su estado de vida libre en el suelo y en simbiosis con plantas no leguminosas. Algunas de estas plantas son componentes importantes del matorral esclerófilo de Chile central, como es el caso de *Colletia hystrix* (Rhamnaceae).

El principal objetivo de esta tesis fue el determinar la estructura genética de las poblaciones de *Frankia* en sus dos habitats (nódulos y suelo) y evaluar la diversidad genética del grupo de diazótrofos y la comunidad bacteriana total asociada a la simbiosis actinorrónica.

El sitio de estudio se localizó en "El Romeral" (Cajón del Maipo, Chile). Se colectó un total de 88 nódulos radiculares de *C. hystrix* y 15 muestras de suelo provenientes de la rizósfera de *C. hystrix* (planta hospedera), de plantas no-hospederas y de suelo sin cobertura vegetal.

El polimorfismo de las regiones intergénicas (IGS) *rnm* y *nif* reveló 15 haplotipos RFLP en la población de microsimbionte de *Frankia* (en el nódulo) asociados a *Colletia hystrix*. Todos los haplotipos fueron exclusivos de cada planta hospedera excepto el haplotipo A3, el cual fue común a todas las plantas y presentó la mayor frecuencia. La cepa Ch14, aislada en la misma localidad en 1991, presenta el haplotipo A3, indicando que este haplotipo es común en esta área y estable en el tiempo.

En la población microsimbionte se determinaron al menos tres grupos genéticamente distintos indicando que existe una heterogeneidad espacial en la población. Adicionalmente, la diversidad genética observada se organizó en un número limitado de haplotipos, lo que nos sugiere que la estructura genética de la población microsimbionte puede ser considerada principalmente clonal, es decir que la variabilidad genética de la población se debe a mutaciones más que a recombinación genética.

La población actinomicete de *Frankia* (población de vida libre) se estudió en la rizosfera de su planta hospedera, no-hospedera y en suelo sin cubierta vegetal. La abundancia medida como unidades genómicas fue mayor en la rizósfera de *Colletia hystrix* ($5,6 \times 10^6$ UG/g suelo) que en el suelo sin plantas ($5-6 \times 10^4$ UG/g suelo). La riqueza genética de la población actinomicete se determinó por el polimorfismo de la región *IGSrrn* que reveló 9 perfiles SSCP. Uno de los perfiles (G1) coincide con el patrón de la cepas ChI4 y además se encuentra presente en los tres habitat estudiados. Contrariamente, a los resultados de la abundancia, la rizósfera de las plantas hospederas presentaron la menor riqueza de genotipos, probablemente como consecuencia de una selección de los genotipos más infectivos por efecto de la planta.

Además se determinó el polimorfismo del "pool" de genes *nifH* de la rizosfera y en el suelo mediante T-RFLP, para evaluar la diversidad genética de las bacteria fijadoras de nitrógeno (gremio o grupo funcional) y el polimorfismo de los genes rDNA 16S para la comunidad bacteriana total. Los resultados indican que

los diazótrofos forman tres grupos, uno reúne a todas las muestras de suelo, el segundo agrupa muestra de rizófora de *C. hystrix* y el tercero agrupa todas las muestras de plantas no-actinorrícas. A mayor nivel de organización ecológica observamos menos homogeneidad entre las muestras de las comunidades microbianas. Sólo la rizosfera de *Colletia hystrix* forman un grupo bien definido.

INTRODUCCIÓN.

Las comunidades microbianas y los procesos que llevan acabo son críticos para el funcionamiento y mantenimiento de los ecosistemas terrestres y la productividad de ambientes como la rizósfera. La rizósfera se define como el suelo que rodea la raíz y cuya microbiota esta influenciada por esta (Kent y Triplett, 2002). Para entender los procesos microbianos asociados a la rizósfera se requiere conocer la composición, estructura y función de los ensambles microbianos a nivel de poblaciones, gremios y comunidades microbianas complejas y a su vez como responden a los cambios ambientales (Young y Ritz, 1998).

La diversidad genética de un ensamble microbiano se define en términos del número de genotipos presentes (riqueza) y la frecuencia (abundancia) de cada uno de ellos. La cuantificación de estos dos parámetros tiene grandes limitaciones al emplear métodos convencionales dependientes de cultivos, porque la mayoría de los microorganismos en los ambientes naturales no son cultivables. Como una alternativa, las comunidades microbianas se describen actualmente basándose en marcadores moleculares, sin un paso previo de aislamiento en cultivos puros. Estos estudios son

inherentemente complejos debido a que todos los métodos empleados tienen sus limitaciones. Sin embargo, el uso de los marcadores genéticos moleculares ha permitido describir la diversidad de microorganismos en distintos ambientes tales como suelo (Hahn *et al.* 1992; Dunbar *et al.* 1999) rizósfera (Lovell *et al.* 2000; Smalla *et al.* 2001; Kuske *et al.* 2002), agua (Fishier y Triplett, 1999), sedimentos (Burke *et al.* 2002) o en interacciones complejas como consorcios (Entcheva *et al.* 2001) y simbiosis (Hahn *et al.* 1997; Guevara *et al.* 2002; Silva *et al.* 2003). Especialmente, por que la mayoría de los organismos son refractarios al aislamiento y cultivo, como es el caso del actinomicete *Frankia*.

Frankia es una bacteria fijadora de nitrógeno que induce la formación de nódulos radiculares en un grupo heterogéneo de plantas angiospermas dicotiledoneas, denominadas plantas actinorrícicas (Torrey y Tjepkema, 1979). En esta simbiosis, los nódulos están formados por agrupaciones de raíces laterales muy cortas que conforman una estructura lobular con elementos vasculares centrales, rodeados de células corticales infectadas con bacterias, que fijan nitrógeno en forma de amonio.

Desde el punto de vista ecológico la bacteria ocupa dos habitats, los nódulos radiculares y el suelo o la rizósfera de las plantas hospederas y no

hospederas. Los métodos moleculares han facilitado el estudio "in situ" de las poblaciones de *Frankia* presentes en los nódulos, donde se observa una mayor diversidad genética que en las cepas en cultivo (o de colección). Sin embargo, estas poblaciones representarían solo una fracción fisiológicamente activa e infectiva de la población del suelo. La utilización de marcadores genéticos mediante técnicas de biología molecular permiten acceder a las cepas que se encuentran en ambos habitats y facilitan la comprensión de la estructura genético-poblacional de estas bacterias y su potencial rol en el ecosistema.

1. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE *FRANKIA*.

1.1 Morfología.

Frankia es una bacteria filamentosa, Gram-positiva, con un alto contenido de G-C (68 al 72%). El micelio es aéreo y esta compuesto por hifas delgadas y septadas de 0,8 a 1,2 μm de diámetro; la hifas se diferencian en esporangios multilóculares terminales o intercalados que contienen numerosas esporas inmóviles. Asimismo, *Frankia* desarrolla vesículas multicelulares en los extremos de sus hifas durante la simbiosis o en condiciones limitantes de nitrógeno en su estado de vida libre. La vesícula es una estructura especializada en la fijación de nitrógeno, en cultivo es esférica

y septada con un diámetro que alcanza los 2,5 a 5 μm , (Benson y Silvester, 1993) y esta envuelta por una estructura de naturaleza lipídica de múltiples capas de compuestos hopanoides tipo esteroide formando una cápsula que protege a la nitrogenasa bacteriana de las altas concentraciones de oxígeno (Harriot *et al.*1991) (Fig 1).

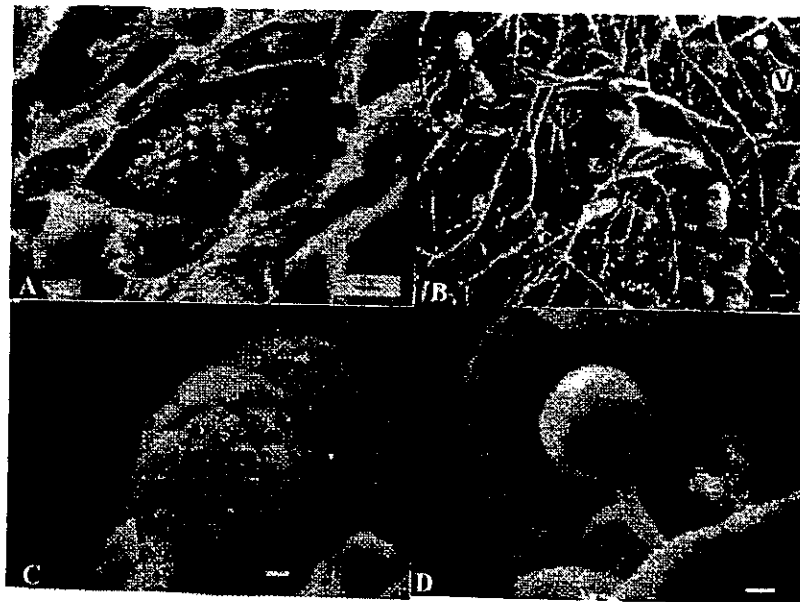


Figura 1. Célula de una planta infectada con *Frankia* (A) y Tipos de células en *Frankia*: B Micelio, C Esporangio y D, vesícula. Fotografía M. Carú

1.2 Taxonomía.

Las características morfológicas de la bacteria, la capacidad de fijar nitrógeno, la infectividad y propiedades químicas de la pared y membrana celular se han empleado tradicionalmente para identificar el género *Frankia*. La pared celular es de tipo III, constituida fundamentalmente por ácido meso-

diamino-pimélico, ácido glutámico, alanina glucosamina, ácido murámico y con un contenido de azúcares totales como ramnosa, mucosa, xilosa, galactosa, 3-0-metil-D-galactosa, glucosa y 2-O-metil-manosa. La membrana celular esta compuesta por un patrón de fosfolípidos tipo PI (fosfatidilinositol, fosfatidilinositol mannosido y fosfatidilglicerol) (Lechevalier, 1994).

La clasificación a nivel de especie dentro el género *Frankia* ha sido controvertida, el primer intento de clasificación fue efectuado por Baker, (1987) de acuerdo a ensayos de inoculación cruzada que se basan en la especificidad de las cepas cultivadas de *Frankia* para inducir la formación de nódulos en ciertas plantas. Con este sistema se definió 4 grupos de infectividad o de especificidad del hospedero conocidos como HSG. El grupo HSG 1 esta conformado por las cepas que infectan especies del género *Alnus* y *Myrica*; el grupo HSG 2, por las cepas que infectan especies de *Casuarina* y *Myrica*; el grupo HSG 3, por cepas que infectan especies de *Elaeagnus* y *Myrica* y el grupo HSG 4, por cepas que sólo infectan especies de *Elaeagnaceae*. Sin embargo, esta clasificación ha sido cuestionada por otros autores porque existen algunas cepas que aún no han sido aisladas de sus hospederos (Hahn *et al.* 1988).

La clasificación realizada por Fernandez *et al.* (1989), basada en las características genotípicas según los patrones de reasociación del DNA-DNA permitió definir 9 especies genómicas, que confirmaron la clasificación por grupos de especificidad. Los grupos genómicos 1, 2 y 3 contienen cepas del grupo de *Alnus* (HSG 1), los grupos genómicos 4, 5, 6, 7 y 8 contienen cepas del grupo de *Elaeagnus* (HSG 3), mientras que el grupo genómico 9 contiene únicamente cepas de Casuarinaceae (HSG 2).

La actual posición taxonómica de este actinomiceto, de acuerdo a los criterios morfológicos, fisiológicos y filogenéticos (basados en el análisis de secuencias del DNA ribosomal 16S), lo ubica en la familia Frankiaceae con un único género *Frankia* que comprende cuatro grupos: (1) el grupo *Alnus*, incluye un amplio rango de cepas que infectan las especies de plantas de las familias Betulaceae, Casuarinaceae y Myricaceae; (2) el grupo *Elaeagnus* que comprende los microsimbiontes de Elaeagnaceae y Rhamnaceae y algunas cepas de *Frankia* presentes en *Gymnostoma*; (3) el grupo *Dryas* que comprende microsimbiontes de las familias Rosaceae, Coriariaceae, Datiscaeeae y del género *Ceanothus* (Rhamnaceae) y (4) el grupo de microsimbiontes que incluye actinomicetos con el fenotipo Nod⁻/Fix⁻, que se refieren a cepas que no infectan, ni fijan nitrógeno en las plantas hospederas

originales (Hahn. *et al* 1989; Normand *et al.* 1996). Estos resultados fueron corroborados por los análisis filogenéticos del gen 23S (Hönerlage *et al.* 1994) y más tarde del gen *recA* (Marechal *et al.* 2000).

2. PLANTAS HOSPEDERAS.

Las plantas que se asocian simbióticamente con *Frankia* se denominan actinorrícicas. Ellas se encuentran distribuídas en 25 géneros incluídos en 8 familias: Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datisceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae y Rosaceae (Benson y Silvester, 1993). Las plantas actinorrícicas son árboles pequeños o arbustos leñosos de poca importancia comercial que se desarrollan en diversos habitats desde las tundras árticas a las regiones templadas y tropicales. Frecuentemente se establecen como vegetación pionera en suelos marginales, siendo de gran utilidad en la reforestación; sin embargo muchas tienen la capacidad de persistir como especies dominantes o componentes más estables en las comunidades vegetales (Benoit y Berry, 1990).

Aunque las plantas actinorrícicas son tan eficientes en la fijación de nitrógeno como las leguminosas (Tjepkema y Winshop, 1980; Benson y Silvester, 1993), se desconoce gran parte de los mecanismos implicados en la simbiosis con *Frankia*. Los avances en los estudios genéticos de la simbiosis

actinorrónica, se han valido del modelo *Rhizobium*-leguminosa, debido a que muchos aspectos de estas dos simbiosis son similares.

3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *FRANKIA*.

3.1 Marcadores moleculares .

3.1.1 Operón *nif*.

La localización de los genes *nif* en *Frankia* se logró a través de hibridaciones heterólogas con genes de otros microorganismos diazotrófos, los genes *nif* están organizados en un operón en el cromosoma de la bacteria (Normand *et al.* 1988; Benson *et al.* 1993) y poseen regiones conservadas y variables que las hacen útiles para la identificación específica por PCR de cepas de *Frankia* (Simonet *et al.* 1990).

La alta conservación del gen *nifH* lo convierte en un marcador apropiado en los estudios de diversidad genética entre las bacterias fijadoras de nitrógeno (Ruvkun y Ausubel, 1980). No obstante, debido a las pocas substituciones nucleotídicas, no es indicado para la discriminación de cepas estrechamente relacionadas (Normand y Bousquet, 1989). Por otra parte, el espaciador intergénico (IGS) entre los genes *nifH* y *nifD* se empleó poco después en la diferenciación de los individuos hasta el nivel de cepa, debido a que son regiones más variables que los genes adyacentes (Rouvier *et al.* 1991).

La IGS *nifH-nifD* también permite la diferenciación del género *Frankia* de otros organismos fijadores de nitrógeno (Simonet *et al.* 1991). Sin embargo, en la actualidad, las secuencias del IGS *nifD-nifK* tienen mayor importancia en la caracterización de cepas (Jamann *et al.* 1993) por su mayor longitud y variabilidad (Normand *et al.* 1992).

3.1.2 Operón ribosomal.

En la identificación y clasificación de los microorganismos se emplea muy a menudo los genes que codifican para el RNA ribosomal 16S (Woese, 1987). Esta molécula se encuentran en todos lo organismos y posee un alto grado de conservación estructural y funcional, además se supone que hay una reducida transferencia lateral de los genes que la codifican. Las moléculas 16S y 23S del RNAr contienen dominios en su secuencia con una tasa de cambio independiente, siendo adecuada para reconstruir la relación filogenética de los organismos (ZuckerandL y Pauling, 1965).

En *Frankia*, el operón ribosomal consta de dos copias idénticas (Normand *et al.* 1992) con dos regiones hipervariables en el gen 16S, empleadas tradicionalmente para estimar relaciones filogenéticas entre especies genómicas de *Frankia*. Sin embargo, los estudios actuales se centran en los espaciadores intergénicos (IGS) de los genes que codifican para los RNAs 16S

y 23S que además de ser específicos, por su variabilidad son de gran utilidad en la distinción entre cepas estrechamente relacionadas.

3.2 Diversidad en las cepas de colección.

Desde el primer reporte del aislamiento de *Frankia* a partir de nódulos radiculares de *Comptonia peregrina* (Callahan *et al.* 1978), se han obtenido numerosos aislados de *Frankia* de diferentes plantas hospederas. Los estudios de diversidad de las cepas se basaron inicialmente en el análisis de los patrones de los fragmentos de restricción (RFLP), con este método An *et al.* (1985), identificaron cepas estrechamente relacionadas. Estas cepas formaron grupos que coincidieron en un 73% con los reportados por Fernandez *et al.* (1989). Posteriormente, Blom *et al.* (1989), identificó diferentes patrones RFLP en cepas aisladas de *Myrica pensylvanica* de acuerdo a la localidad. Los patrones en las proteínas totales confirmó esta diversidad genética en cepas aisladas de *Alnus* (Benson *et al.* 1984) y *Casuarina* (Gauthier *et al.* 1981).

En la actualidad, los fragmentos amplificados por PCR de los genes que codifican para el RNA ribosomal 16S (McEwan *et al.* 1994), el gen glutamina sintetasa (*glnII*) (Cournoyer *et al.* 1994), el espaciador intergénico del operón del RNAr 16S-23S (Rouvier *et al.* 1996; Ritchie *et al.* 1999) y el

espaciador intergénico entre los genes de nitrogenasa *nifH* y *nifD* (*nifH-D*) (Kim *et al.* 1997) o los genes *nifD* y *nifK* (*nifD-K*) (Jamann *et al.* 1993; Nalin *et al.* 1995) son analizados por RFLP.

Todos estos reportes coinciden con determinar una baja diversidad genética en las cepas aisladas en cultivo de *Frankia*.

3.3 Ecología molecular de las poblaciones naturales de *Frankia*.

Todos los organismos se encuentran conformando grupos de individuos estrechamente relacionados sobre la base de similitud de las secuencias génicas. En las bacterias, cada "cluster" de secuencia similares definiría una población ecológica. (Palys *et al.* 1997). La teoría que apoya la correspondencia entre las poblaciones ecológicas con clusters de secuencias similares se basa en las mutaciones adaptativas y establece que: i) cada mutación adaptativa confiere un beneficio sólo a los descendientes genéticos de la población original y ii) las bacterias que poseen una mutación adaptativa competirán sólo con los miembros de la misma población. La selección favorecerá a los mutantes adaptativos dentro de una población en particular, depurando a esa población de una diversidad genética en todos los loci, debido a la baja tasa de recombinación (Cohan, 1994; Guttman y Dykhuizen, 1994). Sin embargo, en bacterias es necesario una definición

operacional ya que el concepto de población y de especie es aún controversial. En el caso de las bacterias del género *Frankia*, estas pueden ocupar potencialmente dos habitats: los nódulos y el suelo. Así podemos definir las poblaciones naturales de *Frankia* como "poblaciones microsimbiontes" para aquellas cepas que se encuentran dentro de los nódulos de su planta hospedera y las "poblaciones actinomicetes" a las bacterias en su estado de vida libre en el suelo o la rizósfera. Desde el punto de vista genético-ecológico, la diversidad de una población es una función de la riqueza de genotipos y de la distribución de los individuos entre las clases genotípicas. En ecología microbiana la mayor dificultad está en estimar el nivel de abundancia de cada biotipo o especie microbiana y por lo tanto en la literatura científica el término diversidad microbiana está más frecuentemente relacionado con la riqueza (Hughes, *et al.* 2001).

Un mayor avance en los estudios de la ecología de *Frankia* resultó del uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ya que permite acceder en forma directa a la diversidad genética de *Frankia* en muestras ambientales (Simonet *et al.* 1991).

El potencial de esta técnica fue inicialmente explorada para los análisis filogenéticos de aislados de *Frankia* (Nazaret *et al.* 1989; Mirza *et al.* 1994;

Benson *et al.* 1996) y posteriormente se ha empleado en la detección y el análisis de poblaciones específicas de *Frankia* en nódulos (Ritchie y Myrold, 1999; Clawson y Benson, 1999) y suelo (Nalin *et al.* 1999).

Actualmente, hay un creciente interés en evaluar la estructura de las poblaciones naturales de bacterianas desde el punto de vista genético. Debido a la naturaleza asexual de las bacterias, el paradigma ha sido que frecuentemente forman poblaciones clonales; no obstante, las bacterias poseen mecanismos de recombinación genética tales como conjugación, transformación y transducción que permite la transferencia horizontal de genes cromosomales entre líneas clonales, por lo que hoy se considera que la estructura genética de las poblaciones bacterianas abarca un rango desde el estrictamente clonal hasta el panmítico (Maynard-Smith *et al.* 1993; Bernhard *et al.* 1998). En una estructura clonal, cada genotipo se reproducirá así mismo en forma de una fotocopia genética. Si la clonalidad permanece preponderante, cada gen en la bacteria tendrá similar historia evolutiva y los árboles contruídos de diferentes loci serán congruentes. Los cambios observados entre las líneas clonales se deberán básicamente por la acumulación de mutaciones (Tibayrenc, 1996).

En el caso de los estudios genéticos de las poblaciones microsimbiontes de *Frankia* se observa un bajo nivel de variabilidad genética que responde a diferentes factores; sin embargo, se tiene un total desconocimiento de la estructura genética de las poblaciones naturales de *Frankia* y como se organiza esta variabilidad en los microsimbiontes o actinomicetes de *Frankia* que coexisten en el tiempo y espacio.

3.3.1 Cuantificación de cepas de *Frankia* en el suelo.

el estudio de la distribución cualitativa y cuantitativa de cepas de *Frankia* ha empleado tradicionalmente el bioensayo de rescate de la bacteria en la planta hospedera (plant-trapping) (Nickel *et al.* 2001; Smolander, 1990). Este ensayo considera a cada bacteria de *Frankia* como una potencial unidad de nodulación (UN), capaz de infectar e inducir la formación de nódulos en el sistema radicular de la planta. De esta forma se estimó que en el suelo, *Frankia* se encuentra en un rango entre 10^5 a 10^3 unidades de nodulación /g de suelo (Van Dijk, 1990; Smolander y Sudman, 1987). Aunque este método proporciona una información valiosa acerca de la capacidad de *Frankia* de inducir nodulos bajo condiciones naturales en el suelo, subestima la diversidad y el número de unidades de *Frankia*, debido a que el método

depende de la capacidad de infección de la bacteria y de la planta hospedera utilizada como blanco en el ensayo.

Los primeros intentos que se hicieron para cuantificar las poblaciones de *Frankia* directamente en el suelo emplearon a la molécula rRNA como blanco. La hibridación género-específica con sondas de oligonucleótidos permitió determinar a las bacterias de *Frankia* con un límite estimado de 10^4 genomas por gr de suelo (Hahn *et al.* 1990). Los métodos de cuantificación basados en la amplificación por PCR de genes específicos combinado con el concepto estadístico del Número Más Probable (PCR-NMP) es una forma alternativa para medir cuantitativamente las poblaciones de *Frankia* del suelo. Este método proporciona una estimación de la abundancia de las poblaciones microbianas determinando el número de unidades genómicas (UGs) presente en el suelo o la rizósfera. Una unidad genómica se define como la cantidad de genomas que contiene una célula de *Frankia*. Por el método de PCR-NMP se estimó que en la rizosfera de plantas hospederas los valores están en el rango de de 10^4 a 10^8 UGs por gramo de suelo. Por lo tanto esta técnica permitir detectar y enumerar los organismos presentes en una muestra ambiental (Myrold y Hus-Danel, 1994; Picard *et al.* 1992).

3.3.2 Estado microsimbionte.

El cultivo de las cepas de *Frankia* es complejo, lo que dificulta el aislamiento de microsimbiontes de plantas como *Adolphia*, *Datisca*, *Ceanothus*, *Dryas*. En otros casos, como los simbioses de Rhamnaceae son difíciles de aislar y solamente se tiene un número limitado de cepas en cultivo (Carú, 1993). Probablemente la mayoría de las cepas aisladas de Casuarinaceae y Betulaceae que son las que se desarrollan fácilmente en cultivo, corresponden a las cepas que crecen eficientemente en forma saprofítica o con requerimientos nutricionales menos estrictos. Por lo tanto la posibilidad de acceder directamente a la bacteria en el estado microsimbionte facilita conocer su diversidad y distribución en un habitat natural.

El estudio de la ecología molecular de los microsimbiontes de *Frankia* se inicia con los trabajos de Hahn *et al.* (1990), quienes emplearon sondas de oligonucleótidos de la región variable rRNA 16S, para detectar cepas de *Frankia* y estudiar su diversidad en experimentos de nodulación. Estos análisis revelaron que en la naturaleza existe una mayor diversidad de *Frankia* que cuando se estudian cepas cultivadas (Benson *et al.* 1996). La mayoría de estos estudios incluyen cepas y microsimbiontes de plantas actinorrícicas como *Casuarinaceae* (Navarro *et al.* 1989), *Elaeagnaceae* y

Rhamnaceae (Clawson *et al.* 1998), *Alnus* (Simonet *et al.* 1989) *Ceanothus* (Benson *et al.* 1996; Ritchie *et al.* 1999) y diferentes especies de *Myricaceae* (Clawson y Benson, 1999b).

Recientemente, los estudios en las poblaciones naturales de *Frankia* tuvo gran avance cuando se empleó técnicas más resolutivas como el análisis del RFLP-PCR en biomarcadores como los IGS *rrn*, y los genes *nif* (Jamann *et al.* 1993; Nalin *et al.* 1995; Lumini y Bosco, 1996). Este análisis permitió determinar la variabilidad de microsimbiontes de plantas de géneros como *Casuarina* (Rouvier *et al.* 1996; Simonet *et al.* 1999), *Gymnostoma* (Navarro *et al.* 1997), *Alnus* (Normand y Chapelon, 1997), *Ceanothus* (Ritchie y Myrold, 1999), entre otros.

Los datos obtenidos en la mayoría de los estudios de microsimbiontes revelan que los nódulos están infectados por una sola cepa (Zepp *et al.* 1997). Una excepción la constituye, los resultados obtenidos por Redell y Bowell, (1986), que muestran que en los nódulos de *Casuarina*, pueden coexistir más de una cepa.

Diversos reportes sugieren que las poblaciones microsimbiontes de *Frankia* de hospederos que crecen a diferentes escalas geográficas presentan una baja diversidad. En los estudios de Jeon y Myrold, (1999) se detectaron

solo dos secuencias diferentes cuando se analizaron poblaciones microsimbiontes de *Ceanothus* en Oregon, USA. A una mayor escala se obtuvieron cinco patrones RFLP-PCR en cepas que nodulan especies de Casuarinaceae nativas de Australia (Rouvier *et al.* 1996). El análisis de diversidad extendido a una escala global sólo aumentó a siete patrones RFLP-PCR en las poblaciones microsimbiontes presentes en *Casuarina* y *Allocasuarina* (Simonet *et al.* 1999).

Los trabajos realizados por Ritchie y Myrold (1999), en las poblaciones microsimbiontes de *Ceanothus* sp, demostraron que la diversidad genética estaría relacionada con el origen geográfico de la cepa. Sin embargo, la caracterización genómica por RFLP de microsimbiontes de *Frankia* evaluadas por RFLPs (Baker y Mullin, 1994) o por rep-PCR (Murry *et al.* 1997) revelan que la diversidad observada estaría relacionado con el origen geográfico de las plantas. Mientras que otros autores como Navarro *et al.* (1999) sugieren que esta diversidad estaría influenciada por el tipo de suelo y la especie de la planta hospedera.

3.2.3 Estado de vida libre.

Aunque sólo se ha reportado un intento exitoso del aislamiento de *Frankia* del suelo (Baker y O'Keefe, 1984), algunos investigadores sugieren

que *Frankia* sobrevive y prolifera en la rizósfera de plantas hospederas (Smolander, 1990) y de no hospederas como un organismos fijador de nitrógeno asociado como en el caso de *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azospirillum* y *Enterobacter* (Rönkkö *et al.* 1993). También se ha indicado que esta bacteria se distribuye ampliamente en el suelo y persiste por un largo tiempo en él, aún después que sus plantas hospederas han desaparecido del lugar (Baker y Schwintzer, 1990; Paschke y Dawson, 1992). Sin embargo, existe escasa información acerca de la ecología de las poblaciones de *Frankia* en el suelo. La mayoría de los estudios describen la población infectiva de *Frankia* en el suelo mediante el bioensayo de rescate de la bacteria en plantas hospederas o "plant-trapping" (Huss-Danell y Myrold, 1994).

El estado fisiológico de las poblaciones de *Frankia* en el suelo puede ser modulada por factores ambientales como la presencia de la vegetación que favorece el crecimiento saprofítico de la bacteria e incrementa su habilidad competitiva en la formación del nódulo radicular (Nickel *et al.* 2001). Como un factor relevante se atribuye a la presencia de la planta hospedera que mantiene y amplifica las poblaciones de *Frankia* (Akkermans *et al.* 1991). Estas poblaciones se desarrollan crecen y persisten por las fuentes de carbono que obtienen de los exudados, lisados y mucílagos de la rizosfera

(Paschke *et al.* 1992). No obstante, en la rizosfera hay una mayor presión por las actividades antagonistas de los microorganismos, como resultado de la competencia por los nutrientes y la secreción de compuestos antibióticos, sideróforos o la combinación de ambos que afectan la viabilidad de las bacterias (De Leij y Lynch, 1997).

Algunos estudios demuestran que las propiedades del suelo afectan las poblaciones de *Frankia* y a las plantas hospederas. Entre los principales factores edáficos que modulan las poblaciones de *Frankia* se encuentra el pH. El rango óptimo para la nodulación y la sobrevivencia del actinomicete se ha estimado que esta cercano a la neutralidad (Griffiths y McCormick, 1984; Smolander *et al.* 1988), este rango coincide con el pH óptimo para el cultivo de la células de *Frankia* (Smolander *et al.* 1987). El contenido de materia orgánica actúa también como un regulador poblacional, en tanto que los altos niveles de nitrógeno y las deficiencias de fósforo disminuyen la capacidad de nodulación (Kohls *et al.* 1987; Sanginga *et al.* 1989). La profundidad del suelo, el curso de la raíz de las plantas (Dawson *et al.* 1989; Nalin *et al.* 1997) y la variabilidad de habitats (Smolander *et al.* 1990) influyen en la distribución de las poblaciones de *Frankia*.

La caracterización genética de las poblaciones de *Frankia* en el suelo se ha valido del bioensayo de rescate de la bacteria en plantas hospederas seguido por un análisis PCR/RFLP del DNA aislados a partir de los nódulos. De acuerdo a este método la caracterización de poblaciones del suelo de *Frankia* asociada a la rizósfera de *Elaeagnus angustifolia* (Jamann *et al.*1992), *Alnus incana* (Smolander, 1990) y *Alnus glutinosa* (Griffiths *et al.*1984), demostró mayor diversidad genética comparadas con las cepas en cultivo. Mientras que el análisis de la estructura de las poblaciones de *Frankia* asociadas a la rizósfera de *Alnus viridis* mostró que los patrones resultantes no guardaron ninguna cercanía con los obtenidos en las colecciones de cepas de *Frankia* (Normand y Chapelon, 1997). En las poblaciones del suelo de *Frankia* que infectan las plantas de *Elaeagnus angustifolia*, Nalin *et al.* (1997) definió 7 perfiles *nif-HaeIII* a diferentes profundidades del suelo.

3.2.4 Diversidad de los ensamblajes microbianos.

El conjunto de microorganismos que realizan y comparten una función en el ecosistema y por lo tanto están relacionados metabólicamente constituye un gremio microbiano. El gremio de fijadores de nitrógeno constituyen cerca de 80 géneros bacterianos pertenecientes a las principales divisiones filogenéticas (Young, 1992) y todos poseen genes *nif*. En el operon *nif* se

encuentra el gen *nifH*, este gen se ha usado como principal bio-marcador para estudiar bacterias diazotróficas y su papel en la estructura de las comunidades microbianas presentes en diferentes habitats (Normand y Bousquet, 1989; Poly *et al.* 2001).

En la actualidad diversos estudios de ecología microbiana están basados en la amplificación por PCR de bio-marcadores como el rDNA 16S u otro gen específico y la posterior resolución de los amplicones por la técnica del análisis por t-RFLP (terminal restriction Fragment length polymorphism) (Liu *et al.* 1997) y más recientemente por SSCP (single strand conformation polymorphisms) (Schwieger *et al.* 1998). Estos métodos permiten obtener un DNA "fingerprint" poblacional, de gremio o comunitario dependiendo del marcador genético utilizado y eventualmente permite identificar los biotipos presente en las muestras ambientales.

4. *Frankia* asociada a plantas de la familia Rhamnaceae.

Varios estudios indican que *Frankia* induce nódulos radiculares en especies de siete géneros de la familia Rhamnaceae: *Colletia*, *Trevoa*, *Talguenea*, *Retanilla*, *Discaria*, *Ceanothus* y *Kentrothamus* (Rundel y Neel, 1978; Medan y Tortosa, 1981; Silvester *et al.* 1985). En Chile, existen cinco géneros de Rhamnaceae noduladas por *Frankia*, estas plantas se caracterizan

La caracterización genética de la cepas que nodulan estas plantas permaneció desconocida por muchos años debido a la dificultad de su aislamiento en cultivos puros, probablemente estas cepas no crecen eficientemente en forma saprofítica ó requieren de suplementos nutricionales más estrictos.



Figura 2. A. Planta de *Colletia hystrix*, B. Nódulos actinorrícicos de *Colletia hystrix*. Fotografía M. carú, 1993

En nuestro laboratorio se han caracterizado fenotípica y genéticamente las cepas de *Frankia* aisladas de las plantas de *Colletia hystrix*, *Retanilla ephedra*, *Talguenea quinquenervis* y *Trevoa trinervis* (Carrasco *et al.*;1992; Carú *et al.* 1990; Carú, 1993). Recientemente se determinó la especificidad de huésped en varias cepas de la familia Rhamnaceae y se encontró que algunas cepas son capaces de reinfectar el sistema radicular de hospederos de la misma especie y de otros géneros de plantas de la familia Rhamnaceae (Carú y Cabello, 1999) como también el género *Elaeagnus* de la familia Elaeagnaceae (Carú *et al.* 2003).

cepas son capaces de reinfectar el sistema radicular de hospederos de la misma especie y de otros géneros de plantas de la familia Rhamnaceae (Carú y Cabello, 1999) como también el género *Elaeagnus* de la familia Elaeagnaceae (Carú *et al.* 2003).

En el estudio de las poblaciones naturales de *Frankia* asociadas a estas plantas actinorrícicas que crecen en su habitat nativo, nos lleva a proponer las siguientes hipótesis: i) la diversidad genética de las poblaciones naturales de *Frankia* asociada a sus plantas hospederas es aún mayor que la observada actualmente en las cepas en cultivo., ii) la diversidad de las poblaciones de *Frankia* estará afectada por factores abióticos (disponibilidad de nutrientes, contenido de materia orgánica y pH) y la presencia de la planta hospedera y iii) las poblaciones de *Frankia* serán predominantes en el gremio de fijadores de nitrógeno y en la comunidad bacteriana total.

Para desarrollar estas hipótesis como objetivo general de esta tesis se propuso determinar la diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* presentes en los nódulos y en la rizósfera de *Colletia hystrix* y evaluar el efecto de las plantas hospederas sobre la composición del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno y la comunidad bacteriana total.

Durante el desarrollo de esta tesis se determinó la diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* presente en nódulos de *Colletia hystrix*, y en el suelo en su estado de vida libre asociada a plantas actinorrícicas, no actinorrícicas y en el suelo sin cobertura vegetal y se correlacionó esta diversidad con parámetros edáficos. La diversidad genética del gremio de fijadores de nitrógeno y de la comunidad total presentes en el suelo y rizósfera de plantas actinorrícicas y no-actinorrícicas también se evaluó.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES

1.1 Cepas, nódulos y muestras de suelo.

1.1.1 Cepas bacterianas .

Las cepas de *Frankia* que se utilizaron como referencia, forma parte de los cultivos de colección del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias. (Carú, 1993) (Tabla 1). La procedencia de las siguientes cepas: *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium sp* y *Escherichia coli* utilizadas como controles, se indican en la Tabla 1.

1.1.2 Nódulos y muestras de suelo.

Las muestras de nódulos y suelos se colectaron a partir de la rizósfera de 5 plantas de *C. hystrix* (Col-1 a Col-5) del matorral esclerófilo de Chile central en los meses de octubre del 2001 y abril del 2002. El sitio de estudio comprendió un área de 22 Mts x 18 Mts ubicada en la localidad El Romeral (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo. Este sitio es una región semi-árida con una alta concentración de la planta hospedera *Colletia hystrix*. Simultáneamente también se colectaron muestras de rizosfera de 5 plantas no-actinorrícicas y de suelo sin cobertura vegetal con el fin de comparar las

poblaciones de *Frankia* de estos sitios. La distribución de las plantas se muestra en en el mapa de la Fig 3.

Los nódulos se lavaron exhaustivamente con agua destilada estéril y peróxido de hidrógeno (30%, v/v) para remover los restos contaminantes que se encuentran en la superficie de los nódulos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta que el DNA se extrajo.

TABLA 1. Lista de cepas referencia empleadas en la tesis.

Cepa	Descripción	Procedencia
Ch1	Aislada de <i>Colletia hystrix</i> en Caleu, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Ch12	Aislada de <i>C. hystrix</i> en Caleu, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Ch13	Aislada de <i>C. hystrix</i> en Romeral, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Ch14	Aislada de <i>C. hystrix</i> en Romeral, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Rel7	Aislada de <i>Retanilla ephedra</i> en Cuesta la Dormida, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Tq15	Aislada de <i>Talguenea quinquinervis</i> en Rio Clarillo, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Tq20	Aislada de <i>Talguenea quinquinervis</i> en Rio Clarillo, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Tt11	Aislada de <i>Trevoa trinervis</i> en Cajón del Maipo, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
Tt142	Aislada de <i>Trevoa trinervis</i> en Caleu, Chile	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	Cepa RCY992, aislado clínico	Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Chile
<i>Nostoc sp.</i>	Microsimbionte de <i>Gunnera</i>	Laboratorio de Microbiología, Universidad de Chile
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>		Facultad de Medicina, Universidad de Chile
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		INIA, Chile
<i>Rhizobium sp.</i>	Cepa CIAT3918	CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia

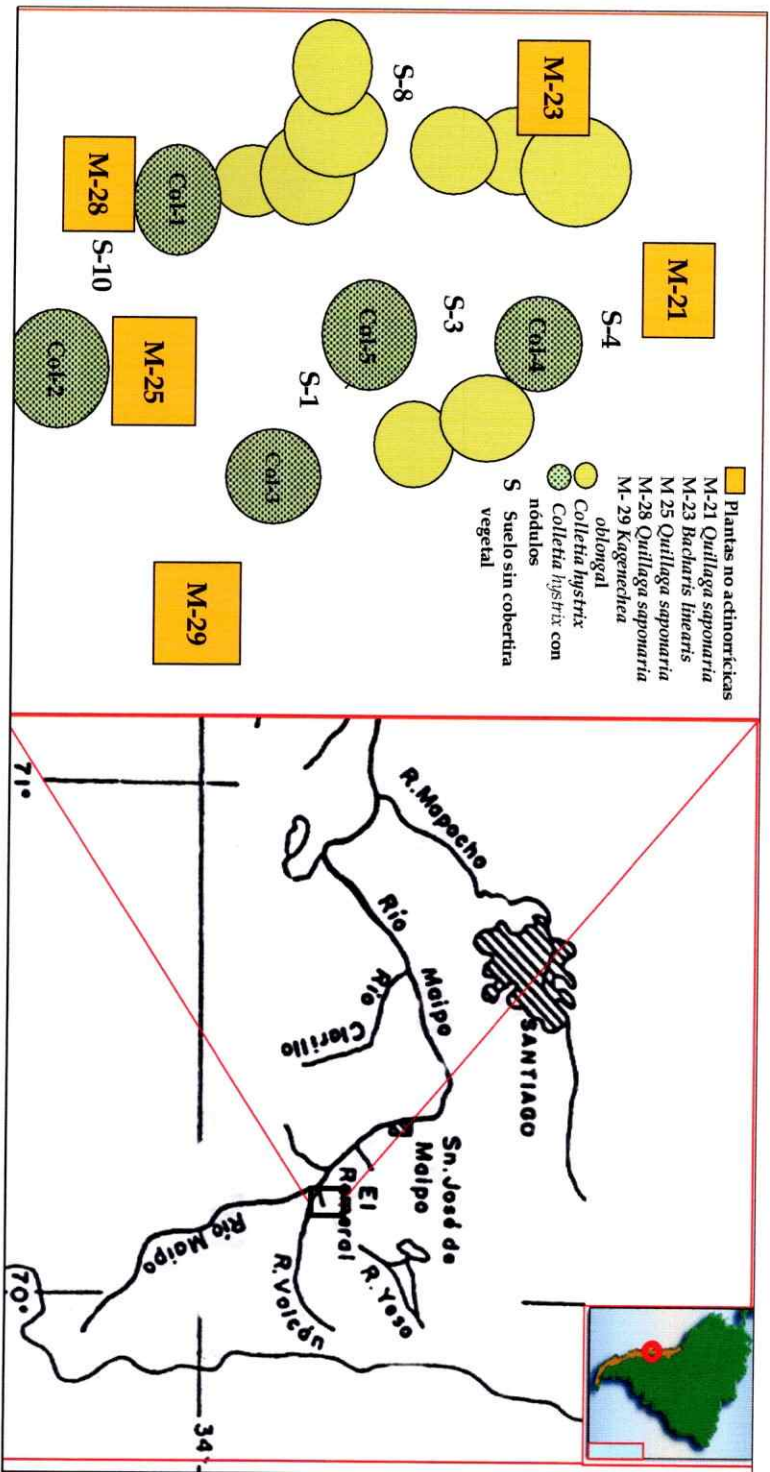


Figura 3. Mapa del sitio de recolección de las muestras de suelo y nódulos en el Romeral, cañón del Maipo.

2. METODOS

2.1 Mantención y Cultivo de las cepas.

2.1.1 Cepa de *Frankia*.

La cepa ChI4 se cultivó a 28°C durante 15 días en medio BAP (Murry *et al.* 1984) conteniendo 1% glucosa y 5 mM NH₄Cl como única fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

2.1.2 Cepas referencia del grupo fijador de nitrógeno.

Klebsiella pneumoniae, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium sp.* y *Escherichia coli* se crecieron a 37°C y 180 rpm durante toda la noche), en medio líquido LB (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l y NaCl 5g/l) al siguiente día se cosecharon por centrifugación para la extracción del DNA genómico.

2.2 Extracción del DNA genómico.

2.2.1 Obtención del DNA de la cepa de *Frankia* ChI4.

El DNA genómico de la cepa referencia ChI4 se extrajo mediante tratamiento con buffer TENC (Tris 100mM, EDTA pH (9,5) 20mM, NaCl 1,4M, CTAB 2%) de acuerdo a la metodología establecida por Lumini y Bosco, (1996). Este DNA se empleó como control para los análisis por RFLP-PCR, SSCP y secuenciación.

2.2.2 Obtención del DNA de las cepas referencia.

El DNA de las bacterias Gram negativas se obtuvo mediante lisis con 400 μ l TE pH 8,0 (Tris HCl 10mM y EDTA 1 mM), 50 μ l SDS al 10% y 50 μ l de proteinasa K (20 mg/ml en TE) con una incubación a 37°C durante 1 hora. El homogenizado se pasó 5 veces a través de una jeringa 26G y este extracto celular se trató dos veces con fenol:cloroformo (1:1) y una vez con cloroformo. El DNA se precipitó con 25 μ l de NaCl 5 M y 1 ml de etanol frío al 95% y se centrifugó por 10 min a 12.000 x g en una microcentrífuga. El precipitado se resuspendió en 40 μ l de buffer TE y se adicionó 5 μ l RNaseA (5 mg/mL en TE). Una precipitación final se realizó por tratamiento con 40 μ l acetato de amonio 5M y 250 μ l de isopropanol e incubando a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 12.000 x g. El DNA se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 100 μ l de TE.

<http://lyco.lycoming.edu/~newman>.

Los DNAs genómicos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Nostoc* sp. fueron donados por los laboratorios de las Facultades de Medicina y Ciencias, de la Universidad de Chile, respectivamente.

2.2.3 Obtención del DNA a partir de nódulos.

El DNA a partir de los nódulos se obtuvo según la metodología propuesta por Bosco *et al.* (1996). Los lóbulos de cada nódulo se excindieron en forma aséptica y se lavaron con buffer TENP (Tris 50 mM, EDTA (pH 8,0) 20 mM, NaCl 100mM y PVPP 1,0%). El extracto celular se obtuvo macerando los lóbulos con mini homogenizadores en buffer TEN-CPP (Tris 100mM, EDTA (pH 9,5) 20 mM, NaCl 1,4 M CTAB 2%, PVP 0,5% y PVPP 0,5%) y se incubó a 65°C por 1 hora en el mismo buffer. La muestra se sometió a tres ciclos de choque térmico (-196 en nitrógeno líquido y a 100°C en agua hirviendo durante 3 min.) El homogenizado se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos en una microcentrifuga. El sobrenadante se trató dos veces con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 x g. El DNA se precipitó con 1/10 volumen de acetato de amonio 0,3 M y 1 volumen de sopropanol frío. Posteriormente se realizó dos lavados con etanol al 70 % , se secó y se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril.

2.2.4 Obtención del DNA a partir de muestras de suelo.

El DNA de las muestras de suelo y rizósfera se obtuvo a partir de 0,25 g de suelo, empleando el kit de extracción "UltraClean Soil DNA Kit" (Mo

Bio Laboratorios[®], Inc. , www.mobio.com). El DNA obtenido se resuspendió en 50 µl de buffer TE.

2.2.5 Cuantificación de DNA.

La calidad y concentración del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1mM) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Sigma[®]), comparándolo con cantidades conocidas del marcador de peso molecular DNA de λ / *Hind*III (Gibco BRL[®]).

2.3 Análisis de las poblaciones microsimbiontes.

2.3.1 Amplificación por PCR del DNA de los nódulos.

La amplificación por PCR de la región IGS 16S-23S (IGS *rnm*) se realizó empleando los partidores FD1 5'- CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' (Weisburg *et al.* 1991) y FGPL2054 5'-GGC TTA CCC CTT TGG GCC-3' (Maggia *et al.* 1992). Las reacciones de PCR contenían 5-10 ng de DNA genómico, 1,5 mM MgCl₂, 10 µg/ml BSA (Gibco-BRL), 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada partidor y 2,5 U de *Taq* polimerasa en buffer PCR (Invitrogen[®]). El PCR se desarrolló bajo las siguientes condiciones: Un ciclo a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

El fragmento correspondiente al IGS *nifD*-K (IGS *nif*) se amplificó empleando el partidor FGPD685-85 (5'-CAC TGC TAC CGG TCG ATG AA-3') (Lumini y Bosco, 1996) y el partidor FGPK333-355 (5'-CCG GGC GAA GTG GCT-3') (Nalin *et al.* 1995). Los ciclos térmicos fueron los siguientes: Un ciclo a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 59°C por 1 min y 72°C por 2 min y luego la extensión final a 72°C por 5 min. Todas las reacciones de PCR se realizaron en 25 µl (volumen final) en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Instruments®, Norwalk, Conn.).

Cinco microlitros del producto de la amplificación se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1mM), seguido por una tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Sigma)

2.3.1 Perfiles RFLP-PCR.

Para definir los perfiles RFLP, los productos de PCR se digirieron independientemente con 5 U de las enzimas de restricción *HaeIII*, *AluI*, *MspI* y *CfoI* (Gibco-BRL®) por al menos 4 h a las condiciones óptimas recomendadas por la casa comercial. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8,0% en buffer TBE (Tris-borato 0,09 M, EDTA 2 mM, pH 8,0) y se reveló con Nitrato de plata al

0,2%. Para efectuar este proceso, el gel se sumergió en solución fijadora (etanol 10% y ácido acético 0,5%) durante 4 min, después de un breve lavado con agua destilada, se sumergió en la solución de plata 0,2% por 5 min y finalmente se reveló adicionando paraformaldehído al 0,3% con agitación constante hasta que las bandas aparecieron. Como marcador de peso molecular se empleó el marcador de peso molecular 100 bp ladder (Gibco BRL®). Los patrones RFLP se determinaron en ambas regiones genómicas para cada muestra nodular, la combinación de estos patrones permitió definir los haplotipos o grupos RFLP-PCR- para cada muestra.

2.3.2 Secuencia parcial de los fragmentos en los IGS *rrn*.

Para determinar las secuencias del IGS *rrn* de la cepa ChI4 y del haplotipo A3 presente en las diferentes plantas se secuenció el extremo 3' de esta región con el partidore FGLP2054. Previo a la secuenciación, los amplicones se purificaron empleando el kit de purificación de productos de PCR (Qiagen®) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial y se detectaron en un secuenciador automático Avant 3100 ABI Prism®(Applied Biosystems, California), las secuencias se alinearon con el programa de alineamiento múltiple Clustal W (Thompson *et al.* 1984) y se compararon con las siguientes secuencias reportadas en la base de datos del GenBank:

ORSO20606 (número de acceso, M55343) de *Casuarina equisetifolia*, AcN14a (M88466), AgTR (AJ40487) de *Alnus glutinosa*, HJVEL (AFO36900), FrCvel-iz (AFO50768) de *Ceanothus velutinus* y *Streptomyces griseus* (M76388). El dendrograma se construyó empleando el análisis por neighbor joining con las distancias genéticas calculadas por Jukes & Cantor's en el programa TREECON (Van de Peer y De Wachter, 1994). Los valores de bootstrap fueron desarrollados sobre 1.000 replicas.

2.3.3 Análisis de datos y construcción de dendrogramas

Para estimar la diversidad genética para cada locus (h) en la población microsimbionte, se utilizó la expresión $h = 1 - \sum x_i^2 [n/(n-1)]$, donde x_i es la frecuencia del i -ésimo alelo en cada locus, n es el número de aislados o haplotipos singulares en la muestra y la diversidad genética (H) se calculó como la media aritmética de los valores de h de los loci estudiados (Nei, 1972). Los tamaños de los fragmentos de restricción se determinaron con el programa Kodak Digital Science ID. Cada individuo fue identificado por una patron de bandas en un formato binario de presencia (1) o ausencia (0). El cálculo de la distancia genética entre grupos y entre individuos se realizó empleando el coeficiente de Jaccard. Los dendrogramas se construyeron usando el algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with

Arithmetic mean) con el programa TREECON (Van de Peer y De Wachter, 1994) con el paquete de inferencia de filogenia PHYLIP, (version 4.5c by Joseph Felsenstein, University of Washington, Seattle, WA) (Felsenstein, 1988).

El índice de diferenciación genética intrapoblacional y entre poblaciones microsimbiontes se calculó con la prueba no paramétrica de Mantel, version 2.0 (<http://www.sci.qut.edu.au/NRS/mantel.htm>). El grado de significancia se evaluó mediante el uso del procedimiento de Monte Carlo, que redistribuye la matrix binaria para generar valores de bootstrap sobre 1.000 replicas. Para examinar las relaciones entre matrices de distancia genética y geográfica se empleó una correlación no paramétrica (coeficiente de correlación de Spearman). El dendrograma basado en la distancia genética entre grupos o poblaciones se construyó por UPGMA disponible en el Phylogeny Inference Package (PHYLIP, version 4.5c by Joseph Felsenstein, University of Washington, Seattle, WA) (Felsenstein, 1988).

2.4. Determinación de las unidades genómicas de *Klebsiella pneumoniae* por MNP-PCR.

Para llevar a cabo la cuantificación de la UGs por gramo de suelo de *K. pneumoniae* por el método del NMP-PCR, se realizó diluciones seriadas en réplicas de a tres, a partir de 100 µl de un cultivo bacteriano en fase de

crecimiento exponencial y cada dilución se inoculó en 250 mg de suelo estéril. Las muestras de suelo se incubaron a 4°C durante media hora y el DNA se extrajo empleando el kit de extracción "UltraClean Soil DNA®" (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, Calif.). Se realizó diluciones seriadas (1/10) del DNA obtenido y cada dilución se amplificó para un fragmento de un tamaño aproximado de 800 pb en el gen de la microcina. La amplificación se realizó hasta que la señal fue negativa, los datos se tabularon de acuerdo a la tabla de MNP y se estimó la densidad de la población de *Frankia* en el suelo como unidades genómicas. Los resultados obtenidos se compararon con el recuento de células viables y totales .

2.4.1 Determinación de las unidades genómicas (UG) de *Frankia* por NMP-PCR.

Para estimar la abundancia de las poblaciones del suelo de *Frankia* se diluyó el DNA en un factor de 10, realizando diluciones seriadas, cada dilución se amplificó por triplicado mediante un PCR anidado, empleando partidores específicos para *Frankia*. La primera reacción se efectuó con los partidores FR183: CTG GTG GTG TGG AAA GAT TTA T y FR1401: TTCGGG TGT TAC CGA CTT TCG TGA C (Myrold y Huss-Danell, 1994). Para amplificar un fragmento de 1218 pb en 30 ciclos. La extinción de la señal se

verificó por una segunda reacción que consta de 30 ciclos que amplificó un fragmento de 524 pb empleando los partidores FR484: CAG CAG CCG CGG TAA TAC y FR1009: TGC AGG ACC CTT ACG GA(C/T) CC. Los partidores FR183 y FR1009 son específicos de *Frankia* (Myrold y Huss-Danell, 1994). La reacciones de PCR contenían 1 µl de DNA genómico, 2,0 mM MgCl₂, 10 µg/ml BSA (Gibco-BRL®), 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada partidor y 2,5 U de *Taq* polimerasa en buffer PCR (Invitrogen®). El PCR para cada reacción se desarrolló bajo las siguientes condiciones: Un ciclo a 95°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 50°C por 1 min 72°C por 2 min y luego 72°C por 10 min. Los amplicones resultantes se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio y el número de reacciones positivas y negativas para cada dilución fueron tabuladas para la estimación de los valores del MNP. El número de Unidades Genómicas (UG) de *Frankia* se determinó de acuerdo a la tabla de Conchran.

2.5. Generación de los perfiles SSCP.

Para aplicar la técnica de SSCP (Single Strand Conformation polymorphism) se analizaron dos fragmentos. El primero correspondió al fragmento de 524 pb del rDNA 16S (este fragmento se empleó para estimar el número de unidades genómicas (UGs) de *Frankia*), el fragmento amplificado

se digirió con la enzima *EcoRI*. El segundo fragmento que se analizó, correspondió a la región IGS *rrn*. En este caso se realizó un PCR semi-anidado empleando los partidores Fr485 y FGPL2054 para obtener un fragmento inicial de 1523 pb, que sirvió de molde en la segunda ronda de amplificación con los partidores FGPS-1440 y FGPL-2054 para obtener el fragmento final de 537 pb. Las reacciones de PCR contenían 10 ng de DNA genómico, 2,0 mM MgCl₂, 10 µg/ml BSA (Gibco-BRL®), 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada partidador y 2,5 U de *Taq* polimerasa en buffer PCR (Invitrogen®). Los PCRs se desarrollaron bajo las siguientes condiciones: Un ciclo a 95°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 1 min 72°C por 2 min y luego 72°C por 10 min. El fragmento obtenido se digirió en forma independiente con las enzimas *EcoRI* y *CfoI*.

Los DNAs digeridos se separaron en geles de agarosa al 1,2% y se aisló la banda de 189 bp de la digestión del fragmento de 524 del 16S con *EcoRI*. En el caso del amplicon de IGS rrn de 537 pb se aisló el fragmento de 84 pb y 187 pb obtenidos por la digestiones con *CfoI* y *EcoRI* y respectivamente. El análisis por SSCP se efectuó de acuerdo al protocolo establecido por Dong-Hung *et al.* 1996 (Fig 4). Para desarrollar los perfiles SSCP, las bandas aisladas se purificaron con el kit de limpieza GeneClean® (Life Technologies) y se

sometieron a un proceso de denaturación mediante el siguiente tratamiento: Cinco microlitros del DNA se mezcló con 5 μ l de buffer de danaturación (EDTA 5mM, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05% en formamida al 95%) y se incubó a 95°C durante 10 min. Para evitar la formación de bandas de heteroduplex, el DNA se mezcló con un volumen igual de buffer denaturante alcalino (NaOH 0,1M, EDTA 20 mM) y se calentó a 95°C por 5 min. Las muestras se dejaron enfriar en hielo por 10 minutos y se mezclaron con buffer de carga (azul de bromofenol y xilencianol 0,1% en formamida) para luego ser cargadas en el gel. Las corridas se realizaron por al menos 4 horas a 180 volt en geles de acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 5%. Los fragmentos se visualizaron con tinción con Nitrato de plata al 0,2%. Los geles teñidos se secaron cubriéndolos con papel celofan y se fotografiaron con una cámara Digital Kodak Science ID.

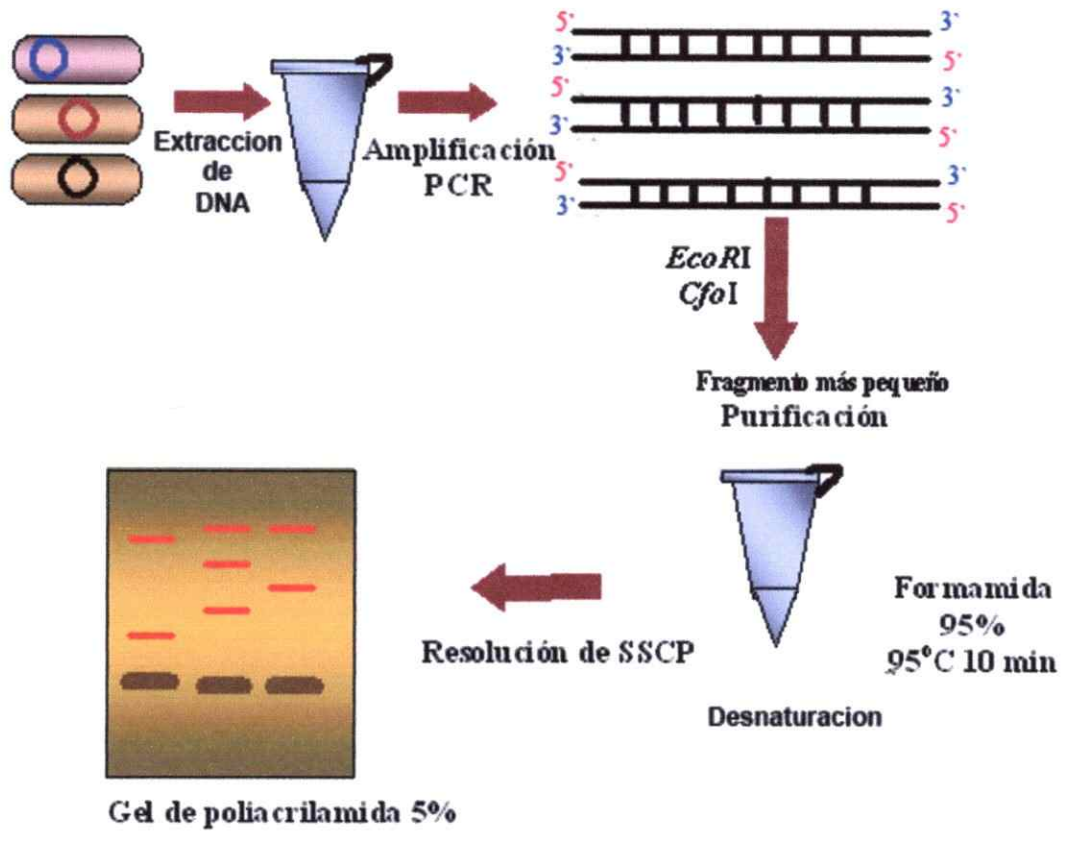


Figura 4. Esquema de la determinación de riqueza de genotipos en la población del suelo de *Frankia* por la técnica del SSCP.

2.5.1 Secuenciación del fragmento del gen 16S.

El fragmento de 524 pb del DNAr 16S se obtuvo por una amplificación por PCR y la banda se excindió a partir del gel utilizando un bisturí, del trozo del gel se purificó el DNA empleando el kit de limpieza GeneClean® (Life Technologies). La secuenciación se realizó en el analizador de secuencias ABI PRISM 3100 Avant-Genetic-Analyzer Prism®(Applied Biosystems, California).

La búsqueda de similaridad de las secuencias en la base de datos se desarrolló con la herramienta de investigación BLAST (Pearson y Lipman, 1988; Altschul *et al.* 1990) y el alineamiento de múltiples secuencias con el programa ClustalW (Thompson, *et al.* 1994).

2.6. Análisis de los genes *nifH* mediante predicción de los perfiles T-RFLP .

Para el análisis se empleó un total de 64 alineamientos de secuencias del gen *nifH*, los T-RFLP se obtuvieron a partir de la base de datos de secuencias genéticas del Genbank y TIGR para la secuencia de *Agrobacterium tumefaciens*. Las secuencias contienen los grupos bacteriales fijadores de nitrógeno comprendidos en las divisiones Proteobacteria, bacterias Verde Sulfurosa, Firmibacteria, Thallobacteria, Heliobacteria, Cianobacteria y Campylobacter. La predicción de los T-RFLP se desarrolló para las enzimas

HaeIII, *HhaI*, *MspI* y *RsaI* y se identificó el sitio de restricción con el programa Webcutter 2.0 (copyright 1997 Max Heiman), www.ccsi.com/firstmarket/first/cutter/cut2.html).

2.6.1 Obtención de los perfiles *nifH* por T-RFLP.

El gen *nifH* se amplificó a partir del DNA de suelo, empleando los partidores PolF (5'-TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3') y PolR (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GAC-3') (Poly *et al.* 2001), este último, marcado fluorescentemente con NED (Applied Biosystems, Oster city. USA®), se amplificó un fragmento de 360 pb entre las posiciones 115 y 476 de la secuencia codificante para el gen *nifH* de *Azotobacter vinelandii* [M20568]. La amplificación se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Poly *et al.* (2001). Aproximadamente 10 ng de DNA se amplificó en 2,0 mM MgCl₂, 10 µg/ml BSA (Gibco-BRL®), 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada partidor y 2,5 U de *Taq* polimerasa en buffer PCR (Invitrogen®). El PCR se desarrolló bajo las siguientes condiciones: Un ciclo a 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C por 1 min 72°C por 2 min y luego 72°C por 3 min. Los patrones de amplificación se verificaron con las cepas referencia del grupo fijador de nitrógeno y la cepa de *E. coli* como control negativo. Los productos amplificados se purificaron con el kit de limpieza de DNA UltraClean PCR Clean-up (MoBio. Laboratories, Inc®) y aproximadamente 50 ng de DNA se

digerió con las enzimas de restricción *HaeIII*, *MspI* y *RsaI*. 2,5 µl de DNA digerido se mezcló con 0,3 µl del estandar de tamaño Genescan 500 Rox size (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y luego 0,4 µl of Azul Dextrano (50 mg por ml of 25 mM EDTA, pH 8,0 con NaOH) y se adicionó 1,8 µl de formamida, antes de la denaturación a 95°C por 3 min. 1-µl de la muestra se resolvió en el secuenciador ABI PRISM 3100 Avant-Genetic-Analyzer Prism®(Applied Biosystems, California) con un tiempo de corrida de 30 min (Fig. 5). Se determinó los tamaños de los fragmentos terminales de restricción (TRFs) entre 20 y 350 pb por comparación con un estandar interno empleando el programa de análisis GeneScan 3.1 (ABI) y se seleccionaron los TRFs con una altura del pico mayor de 100 unidades de fluorescencia.

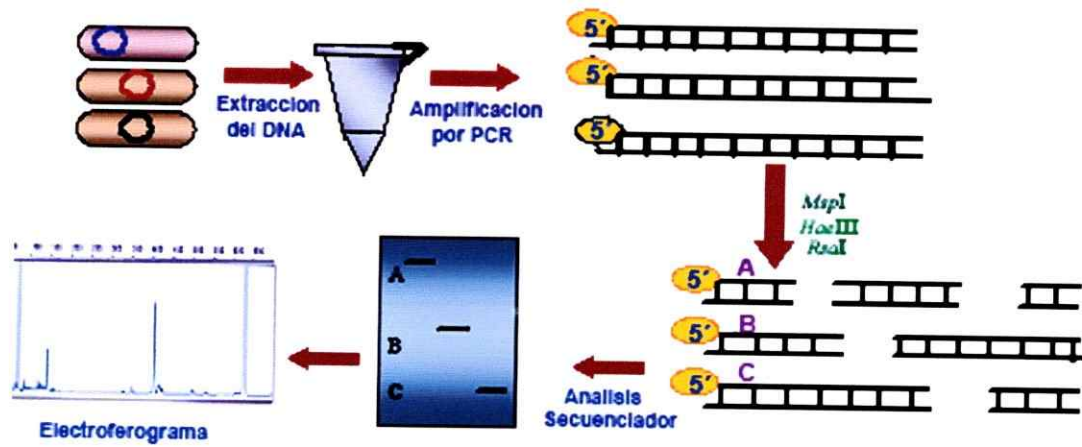


Figura 5. Evaluación de la diversidad genética del pool génico del *nifH* en el gremio fijador de nitrógeno por la técnica T-RFLP.

2.7. Análisis de los perfiles del DNAr 16S.

Los partidores universales empleados para el grupo bacteria fueron: fD1 (GAG TTT GAT CCT GGC TCA GGA CGA A) y rP2 (ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT) (Weisburg *et al.* 1991) y se amplificó un fragmento de 1470 pb del DNAr 16S. Para el análisis cada partidador se marcó fluorescentemente en el extremo 5' con NED (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y se emplearon en reacciones independientes. En cada mezcla de reacción de PCR se empleó 0,2 mM de MgCl₂ 10µg/ml de BSA (Gibco, BRL®), cada dNTP a 200µM, 2,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 10 pmol de cada partidador en buffer PCR (Invitrogen). Los ciclos térmicos comprendieron un ciclo de denaturación a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo adicional de extensión por 5 min a 72°C. Todas las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 25 µl en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Instruments, Norwalk, Conn.). Los productos de la amplificación se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, teñidos con bromuro de etidio. Los productos amplificados se purificaron con el kit de limpieza de DNA UltraClean PCR Clean-up (MoBio. Laboratories, Inc) y 50 ng del producto amplificado se digirió con la enzima de restricción *Hae*III

(Gibco, BRL). La separación de los fragmentos terminales de restricción (TRFs) se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Avant-Genetic-Analyzer Prism®(Applied Biosystems, California) según las condiciones indicadas anteriormente en la sección 2.6.1. Para el análisis se consideraron los fragmentos con un tamaño comprendido entre 60 y 800 pb y una altura de pico mayor de 50 unidades de fluorescencia. Para propósitos de comparar los perfiles comunitarios entre las distintas muestras, los TRFs identificados con el partidor fD1 en el electroferograma fueron confirmados con los TRFs obtenidos con el partidor rP2.

2.8 Análisis de los perfiles T-RFLP en el gen *nifH* y DNAr 16S.

Para el análisis se comparó los perfiles TRFs en un procedimiento de 6 pasos: (i) alineamiento de los perfiles en relación al tamaño molecular, (ii) identificación de las bandas significativas (TRFs ≥ 100 U para el gen *nifH* y ≥ 50 U para el DNAr 16S), (iii) normalización de las unidades de fluorescencia, (iv) determinación manual de bandas únicas entre 1-1.5pb, los fragmentos reunidos en un grupo, se asignaron con el promedio del tamaño del grupo, (v) elaboración de una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0) de TRFs para cada muestra. La similitud entre las muestra fue estimada usando el índice de Nei y Li, 1979 y confirmado por Simple Matching teniendo en

cuenta los TRFs que se encuentran en una o ambas muestras. El dendrograma se obtuvo utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA del programa TREECON. Un análisis de confianza bootstrap se desarrolló sobre 1.000 réplicas para determinar la confiabilidad de la topología del dendrograma, (vi) identificación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de acuerdo a la base de datos de las secuencia del gen 16S empleando el programa MICA. Para el caso del gen *nifH*, se comparó con la base de datos generada en forma manual a partir de las secuencias genicas presente en GenBank y Tigr. Para confirmar los agrupamientos obtenidos en los dendrograma, se realizó un analisis estadístico multivariado, empleando el análisis de componentes principales (PCA) (Gower, 1966).

La diversidad de especies (medida como TFRs) se calculó mediante el índice de diversidad de Shannon ($H_s = -\sum(p_i)(\ln p_i)$), donde s = número T-RFs en la muestra, P_i = abundancia relativa de los TRFs= n_i/N , N = fluorescencia total en todos los TRFs, n_i = fluorescencia en *i-ésimo* TRFs.

2.9 Determinación de los parámetros edáficos

La determinación de los parámetros edáficos del suelo se efectuó en el laboratorio diagnóstico del INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias)

con un análisis químico de micronutrientes, en el cual se considero: contenido de materia orgánica, nitrógeno, potasio, fósforo y pH (Tabla 2).

TABLA 2. Determinación de micronutrientes: pH, contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio en la rizósfera de *C. hystrix*, plantas no-actinorrícicas y de suelo sin cobertura vegetal.

Muestras de suelo	pH	Nitrógeno (ppm)	Fósforo (ppm)	Potasio (ppm)	Materia Orgánica (%)
Col-1	7,2	35	111	194	13,7
Col-2	7,5	34	93	505	11,2
Col-3	7,4	25	79	535	10,5
Col-4	7,7	38	79	369	8,7
Col-5	7,3	20	68	332	8,4
X	7,42±0,17	30,4±6,77	86±14,8	387±123,3	10,5±1,91
M-21	7,2	20	89	406	12,9
M-23	7,4	11	45	230	6,2
M-25	7,4	50	87	590	9,7
M-28	7,3	18	88	220	12,6
M-29	7,6	10	66	780	10,0
X	7,38±0,2	21,8±8,79	75,0±22,15	445,2±250,48	10,28±1,87
S-1	7,3	11	77	236	9,6
S-3	6,9	36	64	272	13,5
S-4	7,1	10	45	222	5,3
S-7	6,7	11	62	236	6,5
S-9	7,0	49	39	232	2,9
X	7,00±0,56	23,4±17,8	57,4±11,03	239,6±53,64	7,56±2,47

RESULTADOS

1. Polimorfismo genético de la población del microsimbionte asociado a *Colletia hystrix* (*Frankia* en nódulos).

La diversidad genética del microsimbionte *Frankia* asociado a *Colletia hystrix* se evaluó en los marcadores IGS r_{rn} y IGS nif por análisis RFLP-PCR. El DNA derivado de 88 nódulos de las plantas hospederas y de la cepa referencia de *Frankia* Ch14 fue amplificado con partidores específicos para las regiones genómicas: IGS r_{rn} y IGS nif y se obtuvo un fragmento de 2047 y 1050 pb, respectivamente (Fig. 6). El IGS r_{rn} incluyó una porción del extremo 3' del DNAr 16S, la región intergénica y un pequeño fragmento del DNAr 23S.

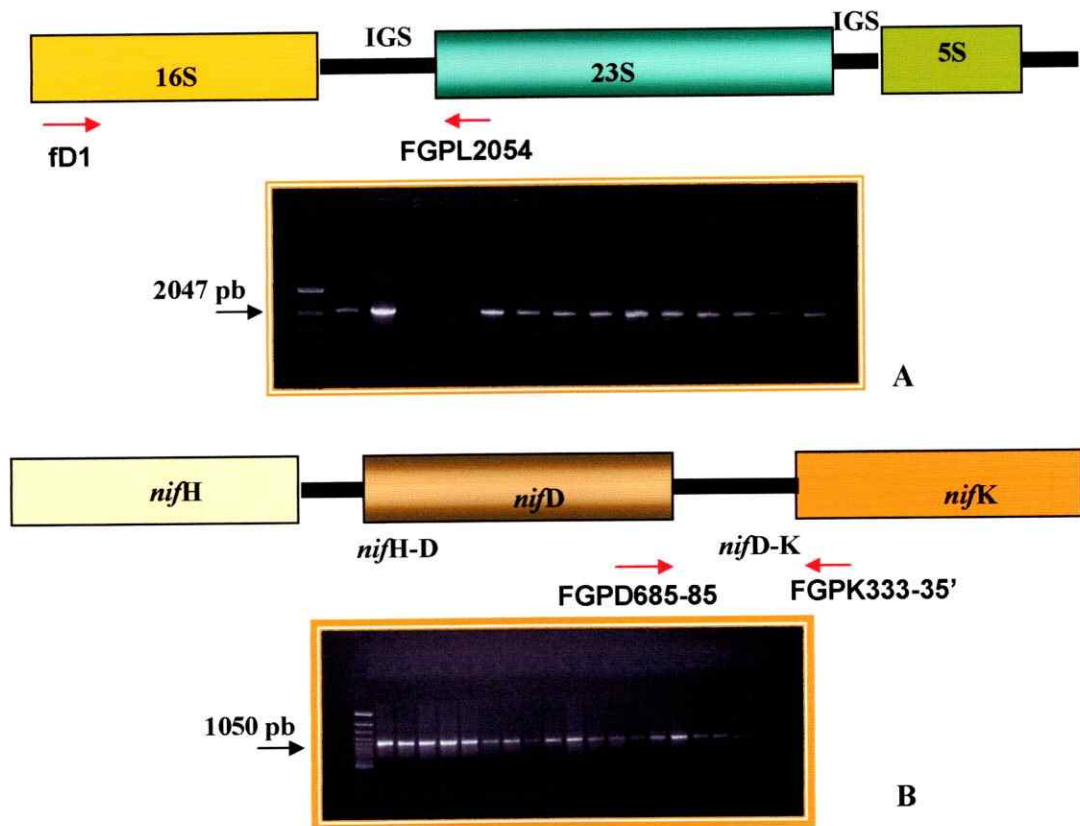


Figura 6. Amplificación por PCR de las Regiones IGS rrn (A) y IGS nif (B) en los microsimbiontes presentes en la planta hospedera de *C. hystrix*.

Para el análisis por RFLP-PCR se emplearon cuatro enzimas de restricción en las dos regiones intergénicas mencionadas. Los patrones que se generaron en cada región genómica se muestran en la Fig. 7. Para generar los perfiles RFLP se empleó cuatro enzimas de restricción (*CfoI*, *AluI*, *MspI* y *HaeIII*). La digestión con la enzima *HaeIII* permitió determinar 49 diferentes fragmentos de restricción en todas las muestras analizadas con nueve patrones en cada región IGS. Los patrones de restricción generados por RFLP-PCR en el IGS_{rrn} fueron designados desde A hasta I, estos perfiles contienen entre ocho a doce fragmentos de un tamaño entre 80 a 300 pb (Fig. 7A). Los patrones de restricción en la región IGS_{nif} fueron designados del 1 al 9, en esta región genómica se encontró entre seis y ocho fragmentos con un tamaño que varió entre 70 a 270 pb (Fig. 7B). Los fragmentos de restricción menores de 70 pb y mayores de 300 pb no se consideraron para el análisis. La digestión con la enzima *CfoI* no mostró polimorfismo en ninguna de las dos regiones, *MspI* resolvió dos patrones en la región IGS_{nif} y *AluI* fue capaz de identificar tres patrones en la región ribosomal y dos patrones en la región IGS_{nif}. Sin embargo, estas tres enzimas no aumentaron los haplotipos o grupos RFLP-PCR obtenidos con *HaeIII*. Por lo tanto, el análisis se realizó teniendo en cuenta únicamente los perfiles obtenidos con *HaeIII*.

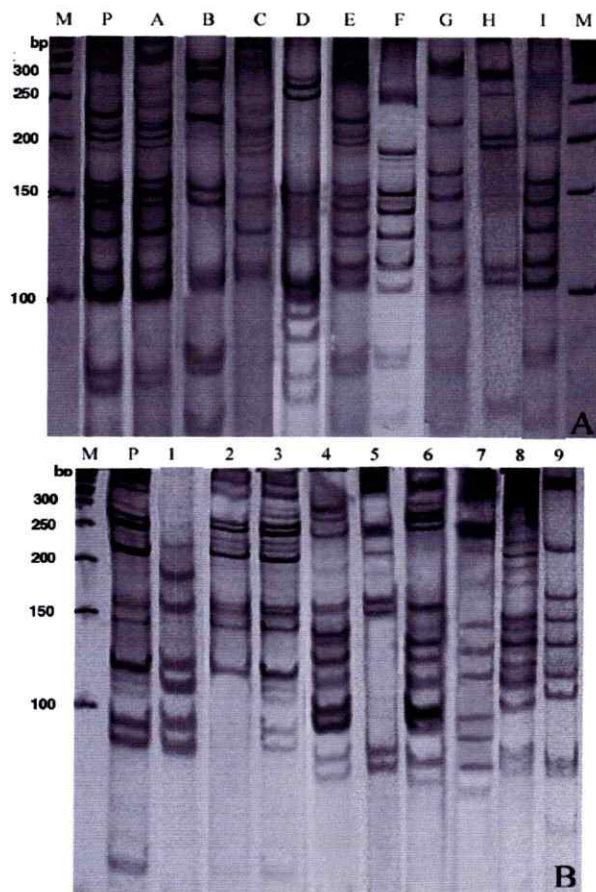


Figura 7. Patrones RFLP-PCR obtenidos a partir de las regiones amplificadas en el *IGS_{rrn}* (A) y la región *IGS_{nif}* (B). El carril M corresponde al marcador de P.M 50 bp. El carril P representa la cepa Chi4. Los carriles A-I y 1-9 representan los patrones de restricción encontrados en los microsimbiontes analizados. Estos patrones se encuentran en la Tabla 2.

1.1 Análisis de los grupos RFLP-PCR.

La combinación de los patrones de restricción obtenidos en ambas regiones genómicas definió 15 grupos RFLP-PCR o haplotipos en los microsimbiontes de las 5 plantas estudiadas (Tabla 3). En el análisis se consideró a los microsimbiontes asociadas a cada planta como un grupo independiente debido a que cada planta se presentó diferentes haplotipos, excepto el haplotipo A3, el cual fue común a todos los grupos y el más abundante con una frecuencia total del 0,62 (Tabla 3). Este haplotipo también se observó en la cepa de referencia ChI4 aislada previamente de *C. hystrix* en la misma localidad, lo cual indica que además de ser el más común en esta área es muy estable en el tiempo.

Para determinar los cambios nucleotídicos no detectados por el análisis RFLP-PCR se secuenció un fragmento de 362 nucleótidos del haplotipo A3 correspondiente a la región integénica 16S-23S. La secuenciación se realizó en cinco muestras nodulares de cada planta hospedera. El alineamiento de las secuencias confirmó la identidad de las muestras con el género *Frankia* y mostró un 100% de identidad entre las secuencias y con la cepa ChI4 (Fig. 8), lo que indica que el análisis por RFLP-PCR es capaz de detectar casi toda la diversidad presente entre los microsimbiontes.

TABLA 3. Frecuencia de haplotipos PCR-RFLP en cada grupo de microsimbiontes asociada a una planta hospedera.

RFLP-PCR <i>rrn IGS</i>	Haplotipos RFLP-PCR		Grupos					Frecuencia
	<i>nif IGS</i>	Col-1	Col-2	Col-3	Col-4	Col-5	Total ^d	
A	1	13 ^a	21	15	23	16	88 ^b	
A	3	—	—	—	0,26	—	0,07	
A	4	0,77 ^c	0,81	0,87	0,26	0,56	0,62	
A	6	—	—	—	—	0,06	0,01	
A	9	—	0,10	—	0,13	—	0,03	
B	2	—	—	—	—	0,12	0,02	
B	3	—	—	0,13	—	—	0,02	
C	5	—	—	—	0,22	—	0,06	
D	7	—	—	—	0,09	—	0,02	
E	1	—	—	—	0,04	—	0,01	
E	4	—	—	—	—	0,12	0,02	
F	4	—	—	—	—	0,12	0,02	
G	8	0,23	—	—	—	—	0,03	
H	3	—	0,05	—	—	—	0,01	
I	9	—	0,05	—	—	—	0,01	

^a Número de individuos en cada grupo.

^b Número total de individuos.

^c Frecuencia de cada haplotipo en cada grupo

^d Frecuencia de cada haplotipo en la muestra total.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

ChI4
haplotipo A3-2   AAAACCCGGGGATCAACCCCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTCCCTCTGCGG
haplotipo A3-3   AAAACCCGGGGATCAACCCCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTCCCTCTGCGG
haplotipo A3-4   AAAACCCGGGGATCAACCCCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTCCCTCTGCGG
haplotipo A3-1   AAAACCCGGGGATCAACCCCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTCCCTCTGCGG
HplotipoA A3-5   AAAACCCGGGGATCAACCCCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTCCCTCTGCGG
*****

ChI4
haplotipo A3-2   GAGACTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
haplotipo A3-3   GAGACTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
haplotipo A3-4   GAGACTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
haplotipo A3-1   GAGACTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
HplotipoA A3-5   GAGACTGGAATTCTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
*****

ChI4
haplotipo A3-2   GAAGGCGGGTCTCTGGGCCGGAACCTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
haplotipo A3-3   GAAGGCGGGTCTCTGGGCCGGAACCTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
haplotipo A3-4   GAAGGCGGGTCTCTGGGCCGGAACCTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
haplotipo A3-1   GAAGGCGGGTCTCTGGGCCGGAACCTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
HplotipoA A3-5   GAAGGCGGGTCTCTGGGCCGGAACCTGACGCTAAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
*****

ChI4
haplotipo A3-2   ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCA
haplotipo A3-3   ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCA
haplotipo A3-4   ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCA
haplotipo A3-1   ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCA
HplotipoA A3-5   ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCA
*****

```

Figura 8. A. Alineamiento de las secuencias del haplotipo A3 presentes en cada una de las plantas de *C. hystrix* (Col-1 al Col-5) y de la cepa ChI4. El programa utilizado fue ClustalW1,8.

1.2 Diversidad genética del microsimbionte *Frankia* en un único nódulo.

Para determinar si el nódulo puede estar colonizado por más de una cepa de *Frankia*, se analizó individualmente los diferentes lóbulos que forman un nódulo. Todos los lóbulos analizados, derivados de un solo nódulo mostraron idénticos perfiles RFLP-PCR para ambas regiones (Fig. 9). Los resultados indican que los nódulos están colonizados por sólo una cepa o un grupo de cepas estrechamente relacionadas. Por lo tanto para propósitos de análisis cada nódulo puede tratarse como un microsimbionte individual.

1.3 Diversidad genética de microsimbiontes de *Frankia* dentro y entre grupos derivados de plantas diferentes.

La diversidad genética de los microsimbiontes en cada planta de *C. hystrix* calculada en ambos loci y basada en la frecuencia de los haplotipos se muestra en la Tabla 4 . Los microsimbiontes de las plantas Col-4 ($H=0,674$) y Col-5 ($H=0,616$), presentan la mayor diversidad genética comparada con los microsimbiontes presentes en las otras plantas.

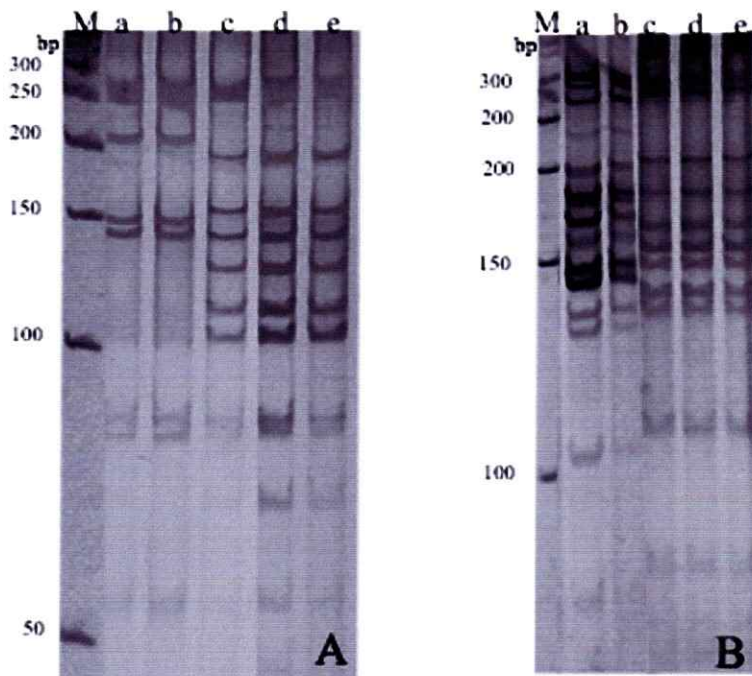


Figura 9. Patrones RFLP-PCR en lóbulos del mismo nódulo. A. *IGSrrn*, B. *IGSnif*
 Carriles a y b corresponden a los lóbulos del nódulo 5; Los carriles c, d y e son los
 lóbulos del nódulo 4.

TABLA 4. Diversidad genética de los microsimbiontes de *Frankia* presentes en *C. hystrix* basada en la frecuencia de cada haplotipo.

Grupos	N° de nódulos (microsimbiontes)	Diversidad Genética (h) ^a		Promedio (H)
		<i>rrn</i> IGS	<i>nif</i> IGS	
Col-1	13	0,383	0,383	0,383± 0,0
Col-2	21	0,268	0,194	0,231± 0,012
Col-3	15	0,242	0,000	0,121± 0,032
Col-4	23	0,543	0,804	0,674± 0,04
Col-5	16	0,611	0,621	0,616± 0,013

^a La diversidad genética esta expresada como $h = n(1 - \sum x_i^2) / (n-1)$, donde x_i es la frecuencia del i ésimo patrón y n es el número de microsimbiontes en la población. H es el promedio de la diversidad genética entre los dos loci estudiados.

Para estimar el nivel de divergencia entre los microsimbiontes, se calculó una matriz de distancia para las 88 muestras teniendo en cuenta la presencia y ausencia de cada banda y se contruyó un dendrograma basado en el algoritmo UPGMA (Fig. 10). En este dendrograma se observó cuatro "Clusters", pero sólo los clusters I y III incluyeron microsimbiontes presentes de una sola planta i.e. Col-4 y Col 5, respectivamente, cabe mencionar que aunque estas plantas presentan la mayor diversidad entre sus microsimbiontes, los haplotipos que estos exhiben están más relacionados genéticamente. Los cluster II y IV son heterogéneos en cuanto al origen de los microsimbiontes.

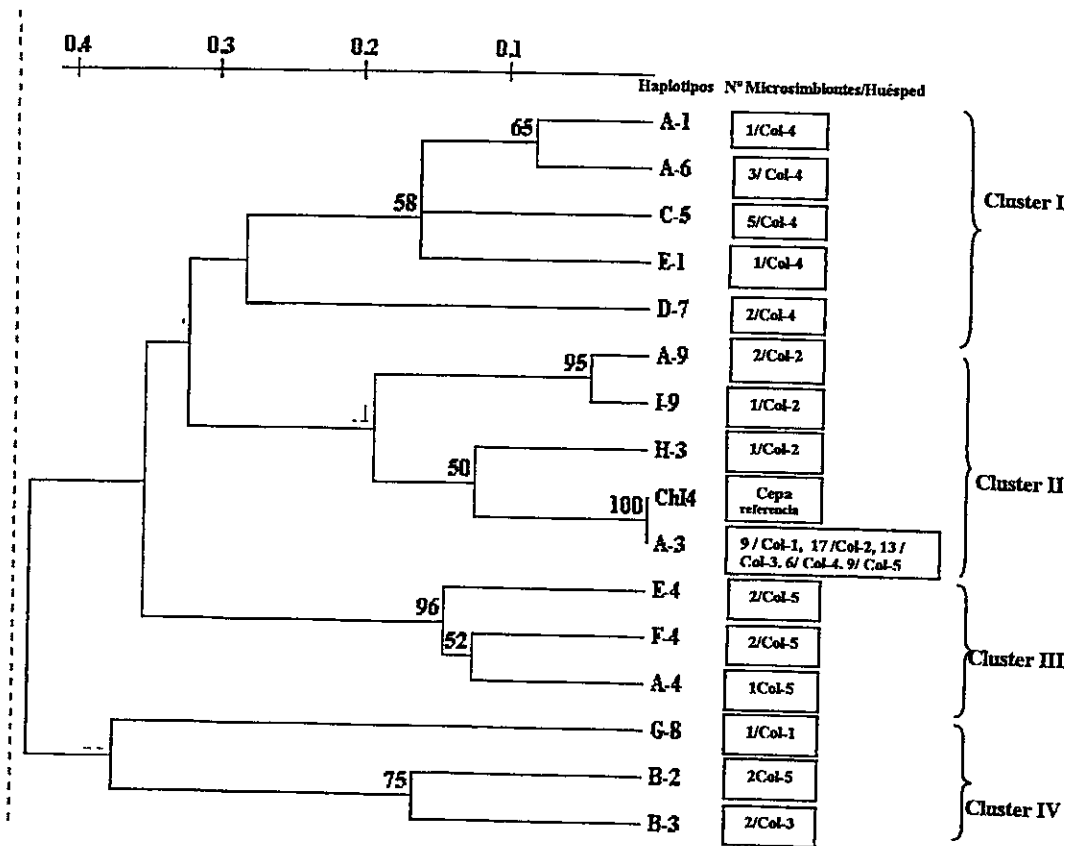


Figura 10. Dendrograma basado en los patrones RFLP-PCR que muestra la relación entre individuos. La distancia genética fue calculada por el coeficiente de Jaccard. El árbol fue obtenido por UPGMA empleando el programa TREECON. Los números en las ramas representan los valores de bootstrap sobre 100 réplicas.

El análisis a nivel de grupo basado en la frecuencia de cada banda y empleando el coeficiente de distancia genética de Jaccard, reveló las diferencias dentro y entre los grupos de microsimbiontes asociadas a cada planta hospedera. Dentro de los grupos, el valor más alto de distancia genética se encontró en las plantas Col-4 (0,3828) y Col-5 (0,4119), indicando nuevamente que son los dos grupos de microsimbiontes más heterogéneos mientras que en la planta Col-3 se registró el menor valor de distancia genética (0,1256) (Tabla 5).

En la población microsimbionte se distinguió tres grupos genéticamente diferenciados con un valor estadístico significativo, ($P < 0,001$, basado en 1.000 iteraciones) de acuerdo a los resultados obtenidos por la prueba de Mantel. Estos grupos son los siguientes: grupo I reúne los microsimbiontes derivados de Col-1, Col-2 y Col-3, el grupo II a los microsimbiontes de la planta Col-5 y el grupo III a los microsimbiontes derivados de las plantas Col-4 (Tabla 5). El dendrograma basado en la distancia genética entre poblaciones se muestra en la Fig 11. La topología del dendrograma que muestra la diferenciación genética entre grupos de microsimbiontes es concordante con la distribución espacial de las plantas hospederas.

TABLA 5. Matriz de distancia genética empleando el coeficiente de Jaccard, los valores en la diagonal son los promedios dentro los grupos, debajo de la diagonal está la distancia genética entre los grupos y sobre la diagonal la distancia geográfica entre los grupos de microsimbiontes de *Frankia*.

Groups	Col-1	Col-2	Col-3	Col-4	Col-5
Col-1	0,2958	5,2	4,5	9,8	6,9
Col-2	0,2414	0,1419	6,4	11,9	9,1
Col-3	0,2255	0,1410	0,1256	7,2	4,6
Col-4	0,4820*	0,4140*	0,4129*	0,3828	2,9
Col-5	0,3977	0,3325*	0,3205	0,4875*	0,4119

* Los valores de p-values de los grupos comparados ≤ 0.01

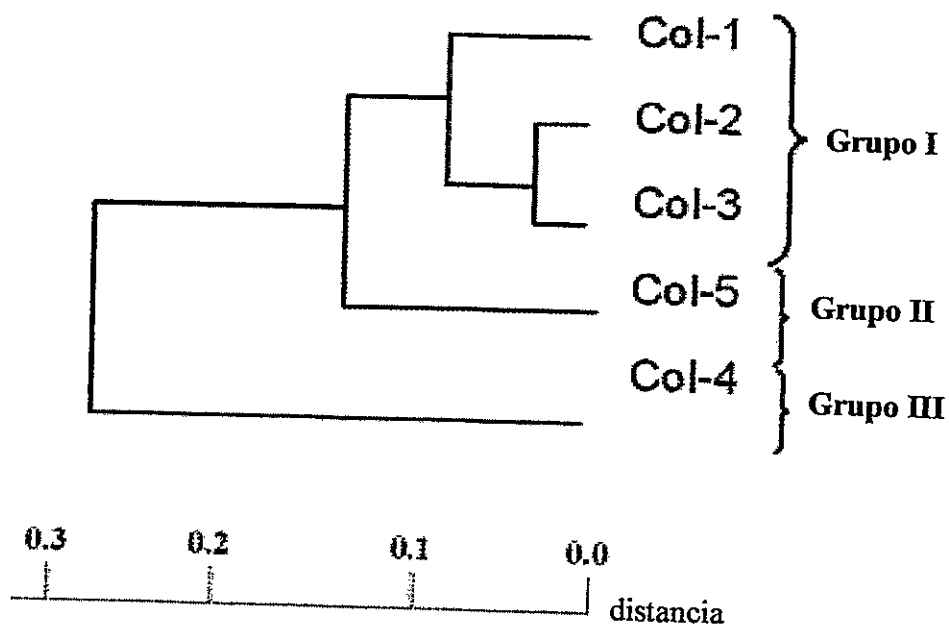


Figura 11. Dendrograma de los grupos de microsimbiontes basado en los coeficiente de disimilitud de Jaccard y un agrupamiento UPGMA. Las poblaciones identificadas corresponden a grupos de microsimbiontes genéticamente diferentes con un valor de $p \leq 0.01$ (Tabla 4).

La distancia genética entre los microsimbiontes asociados a cada planta hospedera no se correlacionó con la distancia geográfica según el análisis de correlación no paramétrica ($R_{\text{spearman}} = 0,1393$, $p\text{-level } 0,7$). Sin embargo, la diversidad genética de cada población versus la distribución espacial de las plantas hospederas sugiere la existencia de una gradiente de valores de diversidad genética que podría estar relacionada con la distribución espacial y temporal del clon que presenta el haplotipo A3 (Fig 12).

Los datos muestran que la diversidad genética de los microsimbiontes asociados a diferentes plantas hospederas esta organizada en un número limitado de clones (haplotipos) indicando que en estas poblaciones no hay una distribución al azar de los fingerprinting DNA de ambas regiones genómicas o loci que es característico de una población con una alta recombinación, sugiriendo que la población tiene una estructura clonal. Los haplotipos esperados y observados entre los microsimbiontes se muestra en la Tabla 6.

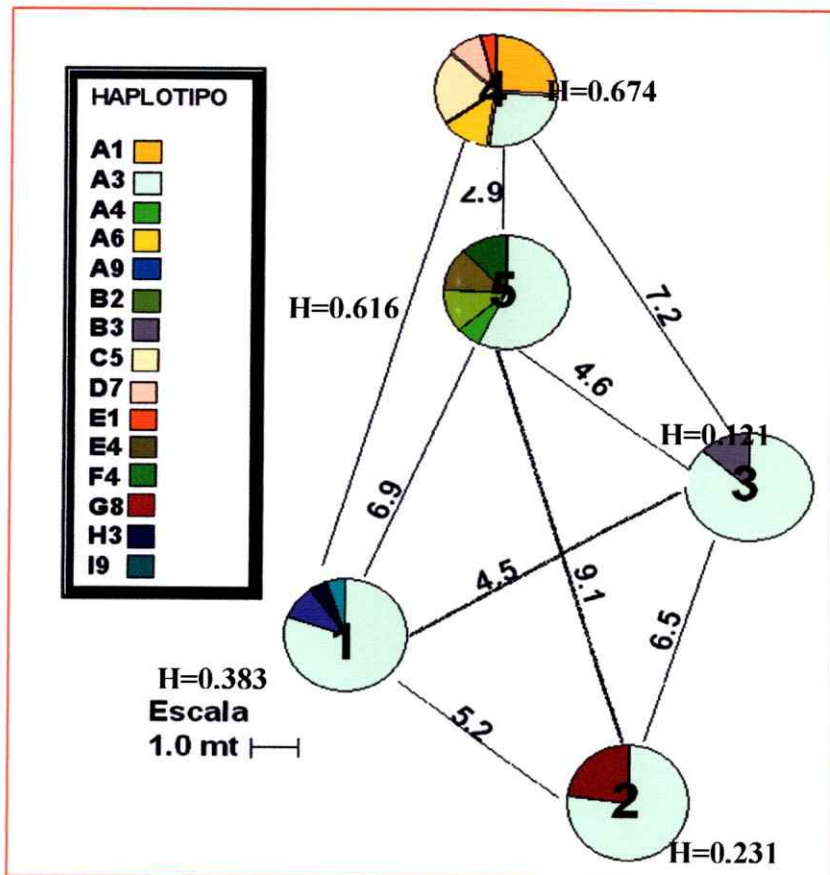


Figura 12. Mapa que muestra la relación entre la distribución espacial y la diversidad genética de los haplotipos de los grupos microsimbiontes presentes en cada planta hospedera.

Tabla 6. Estructura genética de la población microsimbionte presente en las plantas hospederas de *C. hystrix*. Los cuadros en blanco representan los haplotipos esperados y los amarillos los observados. La escasez de haplotipos observados nos indica que la estructura de la población es clonal

		Alelos								
<i>nif</i> <i>rrn</i>		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alelos	A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
	B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
	C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
	D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
	E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
	F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
	G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
	H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
	I	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9

2. Análisis de *Frankia* en el suelo.

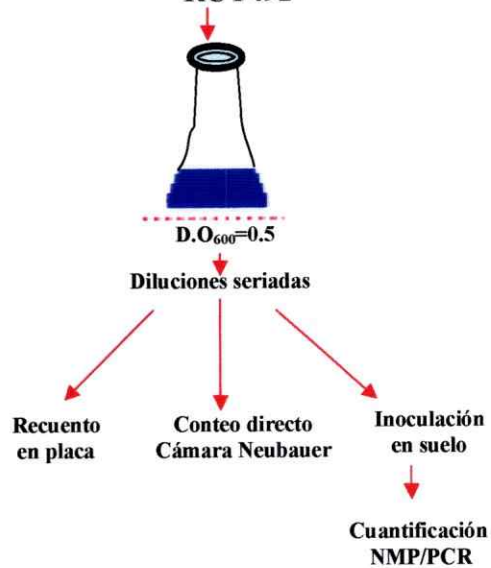
2.1 Comparación de la técnica del NMP-PCR con otros métodos de cuantificación de bacterias.

El análisis de la población actinomicete por la técnica del PCR-NMP requirió determinar el grado de sensibilidad de la técnica. Se empleó la cepa RCY492 de *Klebsiella pneumoniae* y se amplificó el gen de la microcina que se encuentra en el cromosoma de la bacteria como copia única. Se tomó 100 µl del cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial (D.O₆₀₀ 0,5) y se realizó diluciones seriadas (1/10), se tomó 100 µl de cada dilución para efectuar una cuantificación por los siguientes métodos: un recuento en placa de células viables, un conteo directo de células totales en el microscopio empleando la cámara Neubauer y una estimación de Unidades Genómicas (UGs) por el método del NMP-PCR. Se hicieron tres determinaciones independientes para los tres procedimientos de enumeración.

Los resultados mostraron que las unidades genómicas (UGs) de *K. pneumoniae* ($2,5 \times 10^{11}$ UGs/g de suelo) se encuentran un orden de magnitud mayor que el número de células viables (2×10^{10} células /g de suelo) (Fig 13). La diferencia se debe a que el PCR amplifica el DNA de células vivas y muertas. Sin embargo, los valores de UGs fueron

aproximadamente la mitad de los valores obtenidos por conteo directo de células al microscopio (6×10^{11}). Las diferencias podrían deberse al efecto de sorción (adsorción y absorción) de las células a la matriz reduciendo la eficiencia para extraer el DNA. Estos datos indican que la determinación de UGs es un metodología adecuada para estimar la abundancia de un grupo microbiano en una muestra de suelo.

Cepa: *Klebsiella pneumoniae*
RCY492



Diluciones	Células Viables Cels/ml	Células Totales Cels/ml	Unidades Genómicas UGs/ml
10^{-3}	1.4×10^{10}	3.9×10^{11}	0.55×10^{11}
10^{-5}	1.55×10^{10}	6.5×10^{11}	2.3×10^{11}
10^{-7}	1.6×10^{10}	7.5×10^{11}	4.6×10^{11}
promedio	1.5×10^{10}	6.0×10^{11}	2.5×10^{11}

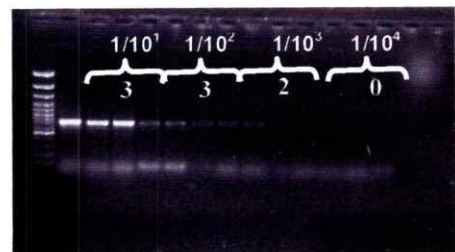


Figura 13. Comparación del método PCR-NMP con las técnicas del recuento en placa de células viables y conteo en el microscopio de células totales.

Para las muestras de suelo, el DNA fue aislado y cuantificado obteniéndose valores en el rango de 10-40 μg de DNA g^{-1} de suelo. Para la estimación de la abundancia por el método del NMP-PCR, las UGs de *Frankia* se determinaron a partir de los productos amplificados del fragmento de 524 pb del DNAr 16S para cada dilución y los resultados obtenidos del número más probable fueron divididos por dos debido a la presencia de dos operones ribosomales en *Frankia* (Normand *et al.* 1992) (Fig. 14A). Para verificar que el fragmento amplificado sólo detectó *Frankia*, el fragmento de 524 bp fue secuenciado y se hizo un Blast el cual mostró un hit estadísticamente significativo con diferentes secuencias 16S de *Frankia* reportadas en la base de datos del GenBank. Por lo tanto, el marcador y el método de cuantificación son adecuados para estimar la abundancia de *Frankia* como UGs en la rizósfera de las plantas de *C. hystrix*, no actinorrícicas y en suelo sin cobertura vegetal.

Los datos muestran que las bacterias de *Frankia* presentes en la rizósfera de *C. hystrix* son la más abundante con un orden de magnitud mayor que en la rizósfera de las plantas no hospedadas y dos órdenes de magnitud mayor que en el suelo sin cobertura vegetal (Fig 14B).

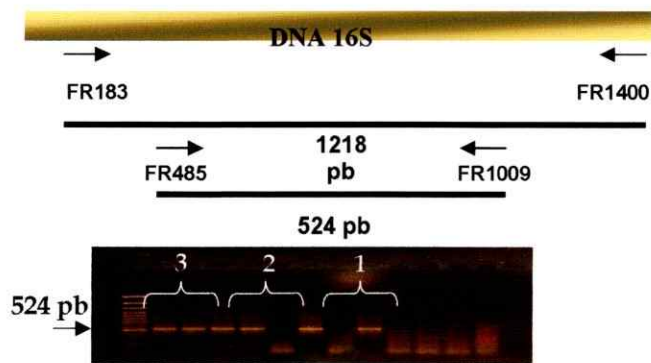


Fig 14A. PCR anidado del fragmento de 524 pb del gen 16S. Se efectuó 3 replicas de cada dilución de la muestra inicial de DNA. Los datos del NMP-PCR 3-2-1-0 para un valor de UGs de *Frankia* de $7,5 \times 10^6$. La flecha indica el tamaño del fragmento amplificado.

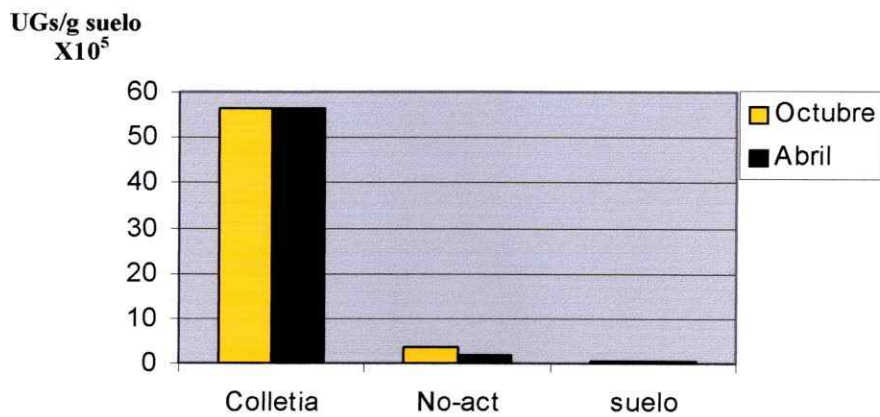


Fig 14B. Cuantificación de la población actinomicete de *Frankia* por el método del NMP-PCR. La población asociada a la rizósfera de *C. hystrix* fue $5,6 \times 10^6$, a la rizósfera de plantas no-actinorrícicas $3,4 \times 10^5$ (octubre) y $1,9 \times 10^5$ (abril) y en suelo sin cobertura vegetal fue de 5×10^4 y 6×10^4 en octubre y abril, respectivamente.

2.2 Análisis de la diversidad genética de *Frankia* en el suelo.

Para evaluar la diversidad genética de *Frankia* en el suelo, una muestra de rizósfera de la planta de *C. hystrix* (Col-3) y la cepa referencia ChI4 fueron secuenciadas en el fragmento de 524 pb del DNAr 16S con el partidor Fr1009. Las secuencias se alinearon y compararon con secuencias del DNAr 16S de diferentes cepas de *Frankia* reportadas en la base de datos del GenBank aislada de *C. hystrix* (Nº de acceso, AF063640), la cepa aislada de *C. hystrix*, (AF063642) y la cepa SCN10a (L40619). En la secuencia de la muestra Col-3 se encontró nueve diferencias nucleotídicas (Fig 15). Sin embargo, cuando se analizó el fragmento de 189 pb del DNAr 16S mediante el perfil presentado en la conformación de la simple hebra (SSCP) solo se observó un perfil SSCP en las cepas de referencia (aisladas de algunos géneros de Rhamnaceae) (Fig 16A) y dos perfiles SSCP en las 15 muestras de suelo (Fig. 16B).

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
1	AFO63642.	-----TTGG	CGCTAAAGAGCTCGT	AGGCGGCTGTCCGG	TCGGCTGTGAAAACC	CGGGGCTCAACCCCG	64	
2	AFO63640.	-----TTGG	CGCTAAAGAGCTCGT	AGGCGGCTGTCCGG	TCGGCTGTGAAAACC	CGGGGCTCAACCCCG	64	
3	A9CHI1-1	-----GC	TTGTCCGGATTITGG	CGCTAAAGAGCTCGT	AGGCGGCTGTCCGG	TCGGCTGTGAAAACC	CGGGGCTCAACCCCG	77
4	SCN10a	-----	AATTATTGG	CGCTAAAGAGCTCGT	AGGCGGCTGTCCGG	TCGGCTGTGAAAACC	CGGGGCTCAACCCCG	69
5	A11COL-2	GTATGGTGCAAAGCGT	TGTCCGGACTTTTGG	CGCTAAAGAGCTCGT	AGGCGGCTGTCCGG	TCGGCTGTGAAAACC	CGGGGCTCAACCCCG	90
e 2.1								
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180	
1	AFO63642.	GGCCTGCAGTCGATA	CGGGCAGGCTAGA-G	TCCGGTAGGGGAGAC	TGGA-ATTCTGGT-	GTA-GCGGTGAAATG	CGCAGATATCAGGAG	150
2	AFO63640.	GGCCTGCAGTCGATA	CGGGCAGGCTAGA-G	TCCGGTAGGGGAGAC	TGGA-ATTCTGGT-	GTA-GCGGTGAAATG	CGCAGATATCAGGAG	150
3	A9CHI1-1	GGCCTGCAGTCGATA	CGGGCAGGCTAGA-G	TCCGGTAGGGGAGAC	TGGA-ATTCTGGT-	GTA-GCGGTGAAATG	CGCAGATATCAGGAG	163
4	SCN10a	GGCCTGCAGTCGATA	CGGGCAGGCTAGA-G	TCCGGTAGGGGAGAC	TGGA-ATTCTGGT-	GTA-GCGGTGAAATG	CGCAGATATCAGGAG	155
5	A11COL-2	GCTTGCAGTCGATA	CGAGCACTAGA-G	TCCGGTAGGGGAGAC	TGGA-ATTCTGGT-	GTA-GCGGTGAAATG	CGCAGATATCAGGAG	176
e 3.1								
	181	195 195	210 211	225 226	240 241	255 256	270	
1	AFO63642.	GAACACCGGTGG-CG	AA-GGCGGGTCTCTG	GGCCGGAAGTGACGC	T-AAGGAGCGAAAGC	GTGGGGAGCGAACAG	GATTAGATACCCCTGG	237
2	AFO63640.	GAACACCGGTGG-CG	AA-GGCGGGTCTCTG	GGCCGGAAGTGACGC	T-AAGGAGCGAAAGC	GTGGGGAGCGAACAG	GATTAGATACCCCTGG	237
3	A9CHI1-1	GAACACCGGTGG-CG	AA-GGCGGGTCTCTG	GGCCGGAAGTGACGC	T-AAGGAGCGAAAGC	GTGGGGAGCGAACAG	GATTAGATACCCCTGG	250
4	SCN10a	GAACACCGGTGG-CG	AA-GGCGGGTCTCTG	GGCCGGAAGTGACGC	T-AAGGAGCGAAAGC	GTGGGGAGCGAACAG	GATTAGATACCCCTGG	242
5	A11COL-2	GAACACCGGTGG-CG	AA-GGCGGGTCTCTG	GGCCGGAAGTGACGC	T-AAGGAGCGAAAGC	GTGGGGAGCGAACAG	GATTAGATACCCCTGG	263
1	AFO63642.	TAGTCCACGCCGTTAA	ACGTTGGGCGCTIAGG	TGTGGGGACCTTCC	ACGGCCTCCGTGCCG	CAGCTAACGCATTAA	CGGCCCGCCT-GGG	326
2	AFO63640.	TAGTCCACGCCGTTAA	ACGTTGGGCGCTIAGG	TGTGGGGACCTTCC	ACGGCCTCCGTGCCG	CAGCTAACGCATTAA	CGGCCCGCCT-GGG	326
3	A9CHI1-1	TAGTCCACGCCGTTAA	ACGTTGGGCGCTIAGG	TGTGGGGACCTTCC	ACGGCCTCCGTGCCG	CAGCTAACGCATTAA	CGGCCCGCCT-GGG	339
4	SCN10a	TAGTCCACGCCGTTAA	ACGTTGGGCGCTIAGG	TGTGGGGACCTTCC	ACGGCCTCCGTGCCG	CAGCTAACGCATTAA	CGGCCCGCCT-GGG	331
5	A11COL-2	TAGTCCACGCCGTTAA	ACGTTGGGCGCTIAGG	TGTGGGGACCTTCC	ACGAGTCCGTGCCG	CAGCTAACGCATTAA	CGGCCCGCCT-GGG	352
6	A11COL-1	TAGTCCACGCCGTTAA	ACGTTGGGCGCTIAGG	TGTGGGGACCTTCC	ACGAGTCCGTGCCG	CAGCTAACGCATTAA	CGGCCCGCCTTGGG	347
EcoRI								
je 5.1								
	361	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450	
1	AFO63642.	GAGTACGGCCGCAAG	GCTAAAACCTCAAAGG	AATTGACGGGGGCC	GCACAAAGCGGGGAG	CATGTGGCTTAAATTC	GATGCAACGGGAAGA	416
2	AFO63640.	GAGTACGGCCGCAAG	GCTAAAACCTCAAAGG	AATTGACGGGGGCC	GCACAAAGCGGGGAG	CATGTGGCTTAAATTC	GATGCAACGGGAAGA	416
3	A9CHI1-1	GAGTACGGCCGCAAG	GCTAAAACCTCAAAGG	AATTGACGGGGGCC	GCACAAAGCGGGGAG	CATGTGGCTTAAATTC	GATGCAACGGGAAGA	429
4	SCN10a	GAGTACGGCCGCAAG	GCTAAAACCTCAAAGG	AATTGACGGGGGCC	GCACAAAGCGGGGAG	CATGTGGCTTAAATTC	GATGCAACGGGAAGA	421
5	A11COL-2	GAGTACGGCCGCAAG	GCTAAAACCTCAAAGG	AATTGACGGGGGCC	GCACAAAGCGGGGAG	CATGTGGCTTAAATTC	GATGCAACGGGAAGA	442
6	A11COL-1	GAGTACGGCCGCAAG	GCTAAAACCTCAAAGG	AATTGACGGGGGCC	GCACAAAGCGGGGAG	CATGTGGCTTAAATTC	GATGCAACGGGAAGA	437
je 6.1								
	451	465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540	
1	AFO63642.	ACCTTACCAGGGCTT	GACATGCACAGAAAT	CCTGTAGAGATATGG	GGTC-----	465		
2	AFO63640.	ACCTTACCAGGGCTT	GACATGCACAGAAAT	CCTGTAGAGATATGG	GGTCCT-----	467		
3	A9CHI1-1	ACCTTACCAGGGCTT	GACATGCACAGAAAT	CCTGTAGAGATATGG	GGTCCGTAAGGNCC	76CA-	493	
4	SCN10a	ACCTTACCAGGGCTT	GACATGCACAGAAAT	CCTGTAGAGATATGG	GGTC-----	470		
5	A11COL-2	ACCTTACCAGGGCTT	GACATGCACAGAAAT	CCTCCNAGATGGGG	GNTCCNTAAGGNCC	CTGCA	507	
6	A11COL-1	ACCTTACCAGGGCTT	GACATGCACAGAAAT	CCTCCNAGATGGGG	GNTCCNTAGGG	-----	493	

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de 524 pb del DNAr 16S de la muestra Col-3 y la cepa Ch11 con las secuencias DNAr de *Frankia* AFO63642, AFO63640, SCN10a reportadas en la base de datos del GenBank.

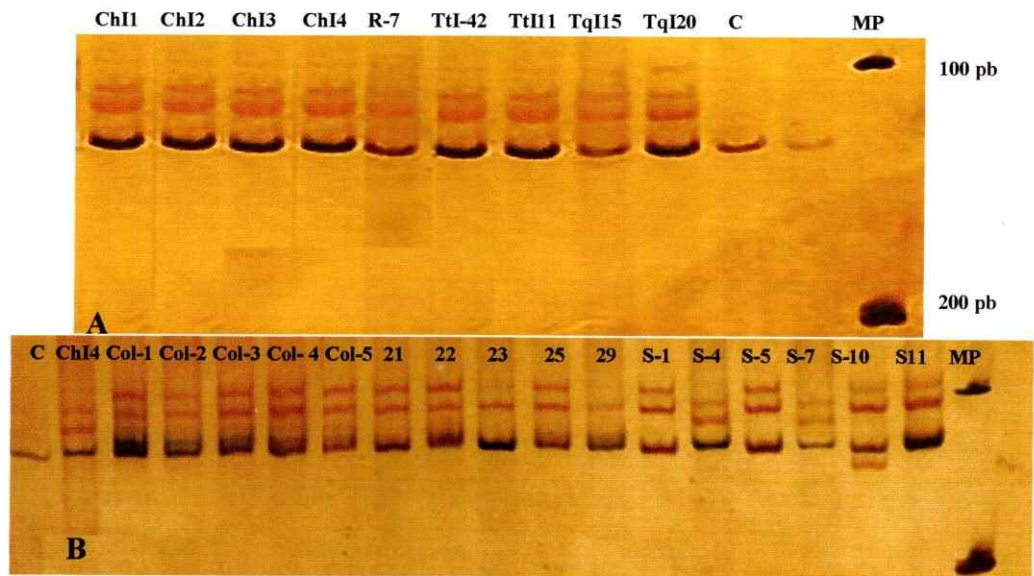


Figura 16. Perfiles SSCP del fragmento de 189 pb obtenido por digestión con la enzima *EcoRI* del amplificado de 524 pb del DNAr 16S. A. Cepas de referencia aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae (ver tabla 1). B. Muestras del suelo: Col1-Col-5 rizósfera de *C. hystrix*; 21, 22, 23, 25 y 29 rizósfera de plantas no-actinorrícicas y S-1, S-4, S-5, S-7 y S-10 de suelo sin cobertura vegetal.

Con el fin de incrementar la resolución de nuestro análisis, se amplificó el fragmento IGS *rsm* de 537 pb (Fig. 17), posteriormente se digirió con las enzimas de restricción *CfoI* y *EcoRI* y se analizó los fragmentos de menor tamaño de 84 y 187 pb, respectivamente. Se observó 4 perfiles SSCP en el fragmento de 84 pb (Fig 18a) y 6 perfiles en el fragmento de 187 pb (Fig.18b). La combinación de los dos perfiles permitió definir 9 genotipos en la población del suelo (Tabla 7).

En nuestro análisis, el patrón de bandas obtenido con cada fragmento (84pb y 187pb del IGS*rsm*) entregó información complementaria que permitió confirmar algunos genotipos. Así, por ejemplo los patrones obtenidos en ambos fragmentos fueron consistentes para las muestras Col-2, M-29, S-4, S-7, y S-10 agrupadas en el genotipo G1 junto con la cepa ChI4, las muestras Col-1, Col-3, Col-4 y S-1 corresponden al genotipo G2, la muestra Col-5 al genotipo G3 y las muestras M-22 y M-23 al genotipo G4. La secuenciación del fragmento de 537 pb se realizó con el partidador FGPL2054 en las muestras de rizósfera Col-1, Col-2, Col-3, Col-4 Col-5, M-25 y en la muestra de suelo S-10. La alineación de las secuencias confirmó la similitud de la secuencia S-10 con la de la cepa ChI4 (Fig 19).

La combinación de los perfiles SSCP obtenidos para cada fragmento *IGS177* se logró determinar genotipos independientes para la muestra M-21 en el genotipo G5, M-25 en el G6 y S-3 en el G7. Además en las muestras S-1 y S-10 se detectó la presencia de dos cepas adicionales con los genotipos G8 y G9, respectivamente.

El perfil SSCP que presentó la cepa referencia ChI4, se encontró en una muestra de la rizósfera de *C. hystrix* (Col-2), en la rizósfera de una planta no actinorrícica (M-29) y en dos muestras de suelo (S-4 y S-7).

En general se observó un mayor número de perfiles SSCP en las muestras de suelo con un índice de riqueza $H=1,59$, mientras que el menor índice de riqueza se registró en la población del suelo asociada a la rizósfera de las plantas hospederas con un índice de riqueza $H=0,95$ (Tabla 7).

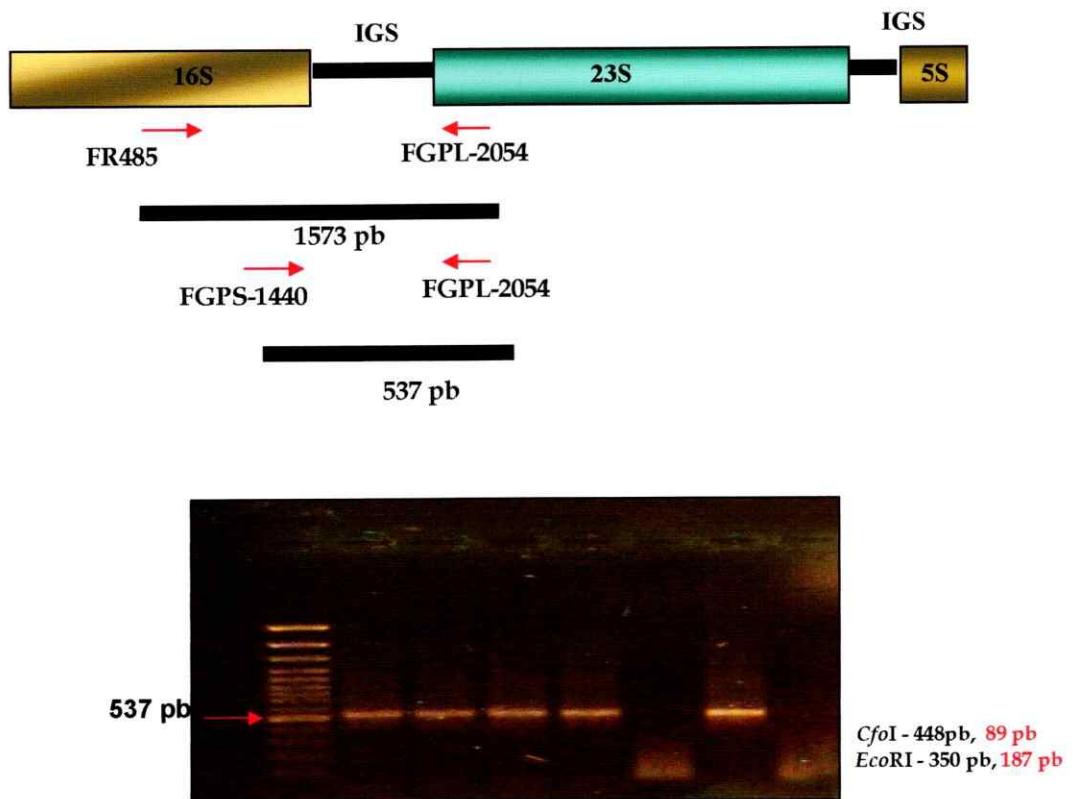


Figura 17. PCR semi anidado del la región IGS_{rrn} para el análisis SSCP. La digestión del fragmento de 537 pb con las enzimas *CfoI* origina dos bandas de 448 y 89 pb, y con la enzima *EcoRI* las bandas de 350 y 187 pb. Para los análisis SSCP se empleó el fragmento de menor tamaño en cada digestión.

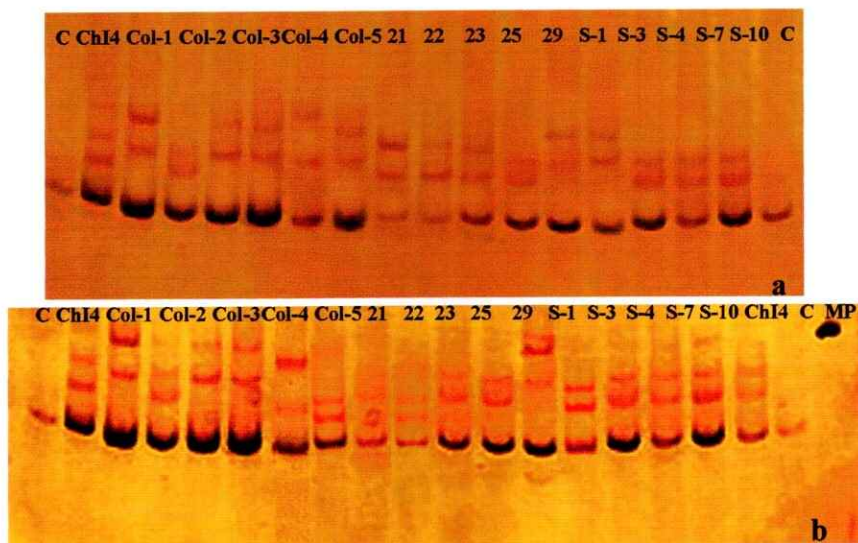


Figura 18. Perfiles SSCP del fragmento de 89 pb (a) y 117pb (b) obtenido por digestión con *CfoI* y *EcoRI*, respectivamente en el producto amplificado de 537 pb de la región *IGSrm*.

TABLA 7. Genotipos SSCP generados por la combinación de los perfiles SSCP de los fragmentos *CfoI* y *EcoRI* en las muestras de suelo y rizósfera.

	Genotipos SSCP									H _s
	G ₁ ChI4	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	
<i>Colletia</i>	1	3	1	-	-	-	-	-	-	0,95
No-Act	1	-	-	2	1	1	-	-	-	1,33
Suelo	3	1	-	-	-	-	1	1	1	1,59

H_s = Índice de diversidad de Shannon

H_s = $-\sum^S (p_i) (\ln p_i)$, donde S= No haplotipos en la muestra,
P_i= haplotipos totales, n_i= haplotipos en el
i-ésimo individuo

EcoRI

```

CHI4sequence 1 T T C C A G C T T G C C T T G C C
S-4          1 T N C C A G G T G C C T T G C C
Col-3        1 T C T G C C A G C C T G N T G N G C T T G C C
M-25         1 T T A A G A T G T G C T A G G G G A
Col-5        1 T T A A G A T G T G C T A G G G G A
Col-4        1 T T C C C T G C C T T G C C A T T T
Col-1        1 A T C C A C C A T T T T G T A C T T G C C A C A T
consensus    1 *. * .. ** *** . ***** . . . . . ** . . . * . . .
  
```

CfoI

```

CHI4sequence  52 AATGAT T A C G T G A A T G A T A C C G G
S-4           54 AAAGAT T A C G T G A A T G A T A C C G G
Col-3         58 AAAGAT T A C G T G A A T G A T A C C G G
M-25          54 TTTCCC T A C G T G A A T G A T A C C G G
Col-5         54 TTTCCC T A C G T G A A T G A T A C C G G
Col-4         54 ATTTAT T A C G A C A C A T T G T A C T A C T C A
Col-1         56 ATTTG T A G A C A C C C G A A G A G A T T C A A T T C T A T A A G T T
consensus     61 * . * . . . . . * . . . . . . . . . * . . . . . * . . .
  
```

```

CHI4sequence  104 T T C T C C C C C C A G G G A G C C
S-4           106 T T C T C C C C C C A G G G A G C C
Col-3         110 T T C T C C C C C C A G G G A G C C
M-25          106 T T C T C C C C C C A G G G A G C C
Col-5         106 T T C T C C C C C C A G G G A G C C
Col-4         108 C T T T A T T T T A T T T T C A T C T T C T A T A C
Col-1         116 A A G T A G C C G C T T T A G T G T C C C T C T T T G T T A
consensus     121 . . . . * ** . . . * . . . . . * . . . . * . . . . . . . . .
  
```

```

CHI4sequence  157 A A C A C A A A C A A A C T A G
S-4           159 T N C A C A A A C A A A C T A G
Col-3         163 A A C A C A A A C A A A C T A G
M-25          159 A A C A C A A A G A A A C T A G
Col-5         159 A A C A C A A A G A A A C T A G
Col-4         166 G T T T A T G A G A G C T G C T C C T G C T A A A T
Col-1         172 T T A G T G T A C G T A G A G G C C T G G T C G C C T C G A G T T
consensus     181 * * . . . . . . . . . * . . . . * . . . . . * . . . .
  
```

Figura 19. Alineamiento de la secuencia de 537 pb del IGS_{rsm} de las muestras de suelo y rizósfera de las plantas de *C. hystrix* y las no hospedadas con la cepa de referencia CHI4. Los cuadros en rosado señalan los sitios de corte de la enzimas *EcoRI* y *CfoI*.

3. Análisis de la diversidad genética del gremio fijador de nitrógeno.

3.1 Análisis de los perfiles T-RFLP en el gen *nifH*.

Para caracterizar el gremio de fijadores de nitrógeno se efectuó un análisis de la diversidad genética del grupo fijador de nitrógeno asociado a la rizósfera de las plantas actinorrícicas, no actinorrícicas y en suelo sin cobertura vegetal, en este análisis se tuvo en cuenta los perfiles generados en cada muestra por la combinación del patrón de digestión con las enzimas *MspI*, *HaeIII* y *RsaI*. Los perfiles consistieron de TRFs con un tamaño o longitud del fragmento (en nucleótidos), el cual es aportado por una bacteria o un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno y con una altura (que refleja la cantidad del DNA marcado con NED) representando la abundancia relativa de cada TRF (Fig 20).

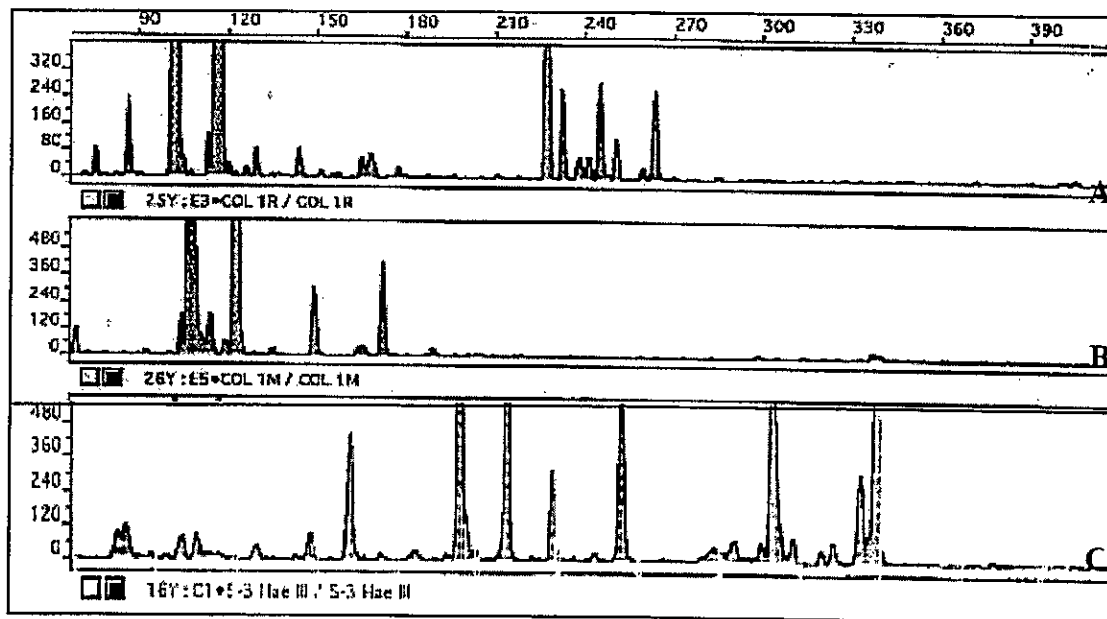


Figura 20. Perfil T-RFLP en el gremio fijador de nitrógeno de una muestra de rizósfera de la planta hospedera Col-1, generado por la digestión con la enzima *RsaI* (A), *MspI* (B) y *HaeIII* (C). El perfil se compone de picos (TRFs) que indican el tamaño del fragmento terminal (en nucleótidos) y la altura (intensidad de fluorescencia).

A partir de los valores de TRFs normalizados se elaboró la matriz binaria de presencia y ausencia de TRFS y se construyó el dendrograma por UPGMA que se muestra en la Fig. 21. En el dendrograma se diferenció tres grupos. El grupo I contiene las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a la rizósfera de las plantas no hospedadas y a la planta de *C. hystrix* Col-4, el grupo II contiene las bacterias que se encuentran asociadas a la rizósfera de *C. hystrix*, mientras que en el grupo III se agruparon únicamente las muestras de suelo con un alto valor de bootstrap, evidenciando una marcada diferencia entre las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el suelo con las asociadas a la rizósfera. Los resultados de este análisis fué corroborado por el análisis estadístico multivariado PCA (Fig 22).

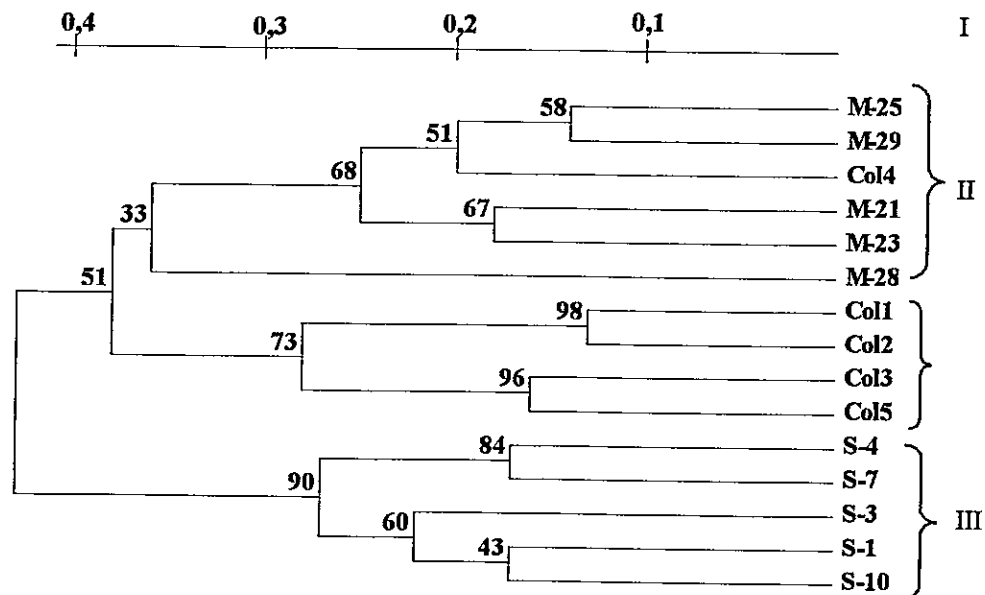


Figura 21. Dendrograma que muestra la relación de las bacterias del gremio fijador de nitrógeno asociado al suelo y la rizósfera de las plantas hospederas y no hospederas. El dendrograma se construyó a partir del análisis de distancia por simple matching y confirmada por el análisis de Nei & Li, 1979 empleando el algoritmo UPGMA en el programa TREECON. Los valores de bootstrap se encuentran sobre las ramas.

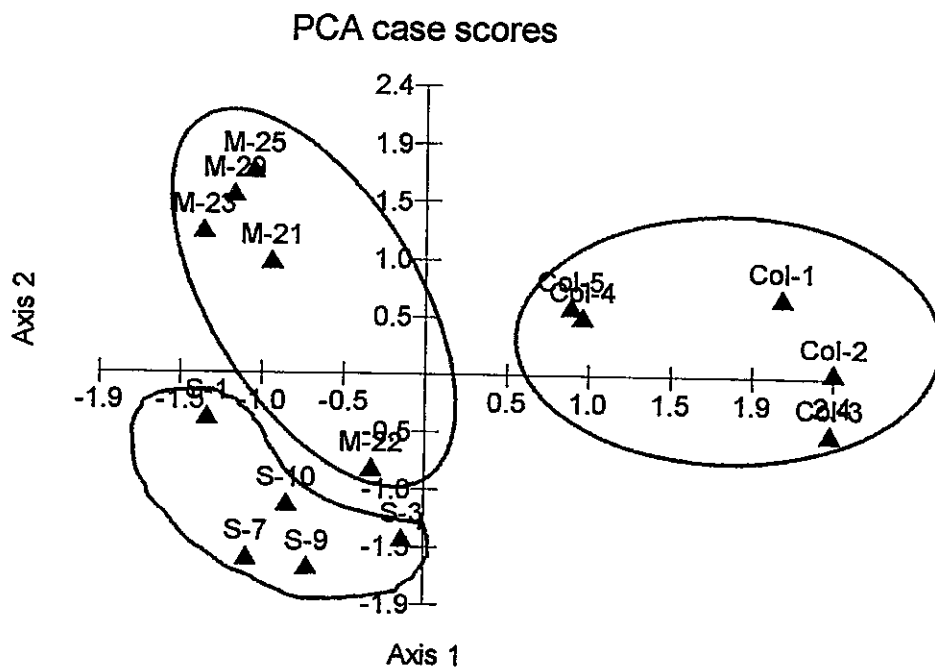


Figura 22. Análisis estadístico multivariado de Componentes principales (PCA) del gremio fijador de nitrógeno de las muestras de suelo y rizósfera analizadas por T-RFLP. El análisis se efectuó teniendo en cuenta los valores de los TRFs de cada sitio estudiado y confirma el agrupamiento por matriz de distancia obtenido en el dendrograma.

3.2 Diversidad del gremio fijador de nitrógeno.

El valor estimado de la diversidad del gremio fijador de nitrógeno de acuerdo al índice de Shannon fue mayor en la rizósfera de *C. hystrix* ($H=1,53$) comparada con la registrada en la rizósfera de las plantas no hospederas ($H=1,46$) y suelo ($H=1,43$) (Tabla 8).

El porcentaje de distribución de los TRFs entre las muestras de suelo y rizósfera estudiadas indica que *Frankia* representó el 13,5% del gremio fijador de la rizósfera de su planta hospedera, en cambio sólo representa el 0,34% de los diazótrofos del suelo sin cobertura vegetal (Fig 23). Estos datos son concordantes con los obtenidos en la cuantificación por NMP-PCR.

TABLA 8. Diversidad genética del gremio de fijadores de nitrógeno y de la comunidad bacteriana total determinada de acuerdo al índice de Shannon a partir del análisis de los perfiles del T-RFLP.

	<i>Colletia hystrix</i> (Rizósfera)	Plantas no- hospederas (Rizósfera)	Suelo sin cobertura vegetal
Comunidad bacteriana	1,42	1,38	1,14
Gremio de fijadores de N ₂	1,53	1,46	1,43

$H_s = - \sum_{i=1}^S (p_i) (\ln p_i)$, donde S= No TRFs en la muestra, P_i = Abundancia relativa de los TRFs= n_i/N , N= fluorescence total en todos los TRFs, n_i = fluorescence en i -ésimo TRFs

Unidades de fluorescencia

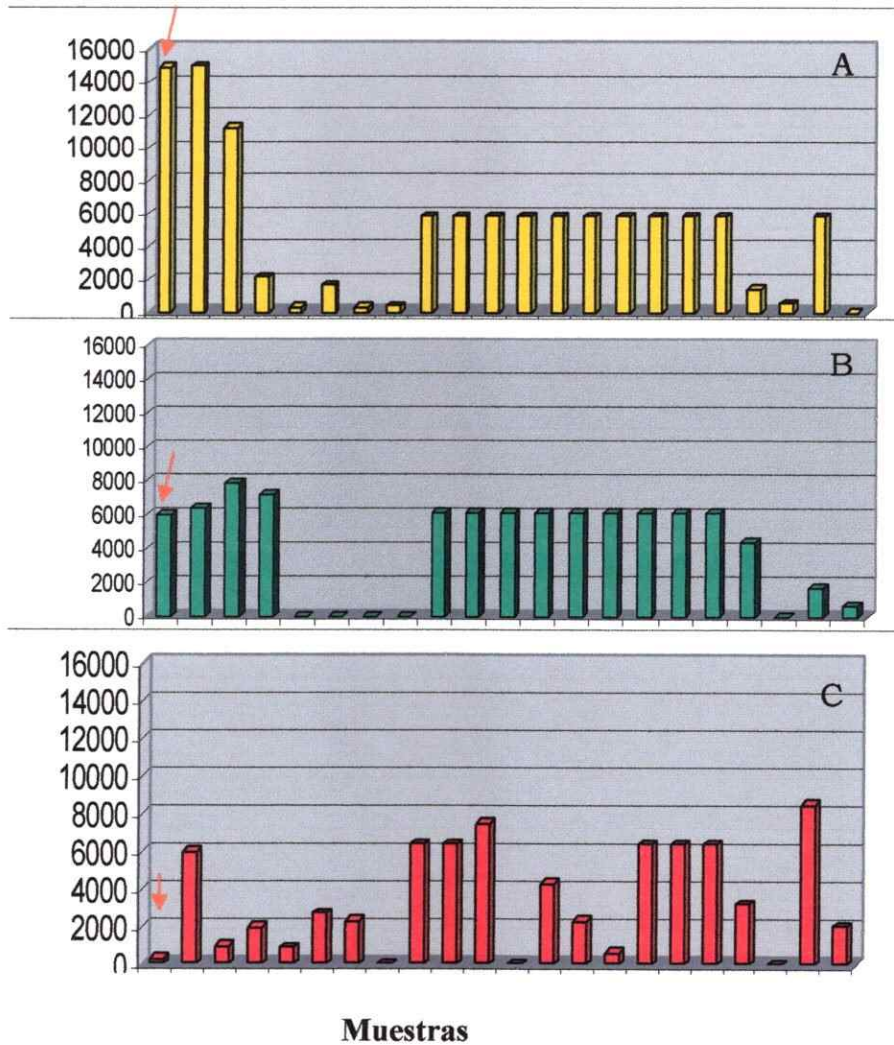


Figura 23. Porcentaje de distribución de los TRFs del gremio de fijadores de nitrógeno. La flecha indica el TRF que corresponde a *Frankia* con una representatividad relativa de: (A) 13,5% en *C. hystrix* (B) 6,7% en Plantas no hospederas y de (C) 0,34% en el suelo.

4. Análisis de la diversidad genética de la comunidad bacteriana.

El "fingerprinting" de la comunidad microbiana se caracterizó por el número, la distribución y la altura de los TRFs, permitiendo diferenciar la estructura de la comunidad bacteriana entre los tres sitios estudiados (Fig 24). Un total de 91 TRFs se identificaron en la rizósfera de las plantas de *C. hystrix*, 79 TRFs en la rizósfera de las plantas no hospedadas y 77 TRFs en el suelo sin cobertura vegetal. en la rizósfera de *C. hystrix* se determinó las mayores unidades de fluorescencia, esta diferencia estuvo probablemente influenciada por intensidad de fluorescencia , aportada por los TRFs con un tamaño de 65, 71, 81, 112, 209 y 213 en la rizósfera de las plantas hospedadas.

Una comparación de la abundancia relativa se realizó entre los tres sitios muestreados y se observó una menor abundancia en el suelo comparada con la rizósfera de *C. hystrix* (Fig 24).

Para obtener la información acerca de la diversidad bacteriana asociada a los sitios de estudio, se comparó los patrones de diversidad de los TRFs mediante el índice de Shannon, dando evidencia que la microbiota del suelo es menos diversa que la asociada a la rizósfera (tabla 8).

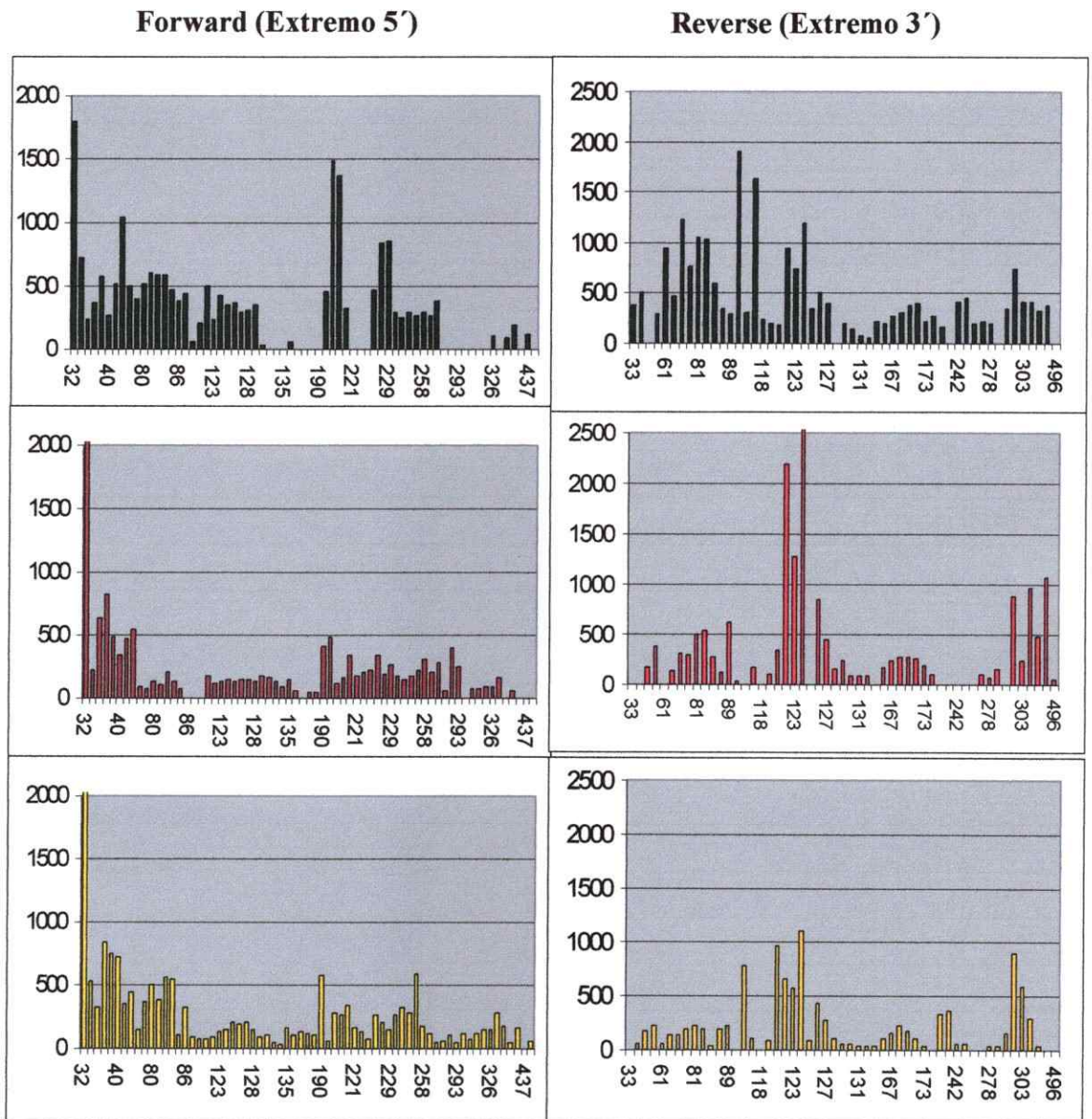


Figura 24. Distribución de los TRFs entre los tres sitios de estudio: rizósfera de *C. hystrix* (A), plantas no actinorrícicas (B) y suelo sin cobertura vegetal (C). La altura del pico representa la abundancia relativa y los número sobre el eje X el tamaño en nucleótidos correspondiente a los TRFs con el partidor forward (fD1) y reverse (rP2).

El dendrograma de la Fig. 25 se construyó empleando la distancia genética entre los TRFs aportados por la comunidad bacteriana asociada a cada sitio de estudio. Las comunidades bacterianas de la rizósfera de *C. hystrix* fueron las únicas que formaron un solo "cluster" (grupo I). Mientras que los grupos II y III estuvieron conformados por muestras de suelo y rizósfera de plantas no hospedadas sin una distinción con respecto al origen de la muestra. Así, por ejemplo tres muestras de suelo (S-3, S-4 y S-9) formaron el grupo I con dos muestras de rizósfera de plantas no hospedadas que corresponde a la especie *Quillaga saponaria* (M-25 y M-21). El grupo III integró la comunidad microbiana del suelo S-1 y S-10 con la de la rizósfera de las plantas no hospedadas M-28, M-23 y M-29 que corresponde a plantas de las especies *Bracharis linearis*, *cactus* sp. y *Kagenechea oblonga*, respectivamente, indicando diferencias en la estructura de las comunidades microbianas del suelo y la rizósfera de las plantas no hospedadas. Este agrupamiento obtenido fue confirmado por el análisis PCA (Fig. 26).

En el análisis de los parámetros edáficos, pH no presentó variación entre los sitios muestreados, siendo cercano a la neutralidad. Del mismo modo, no se obtuvo cambios significativos en los contenidos de materia orgánica, fósforo y potasio en los sitios. El contenido de nitrógeno fue ligeramente mayor en la

rizósfera de las plantas hospederas, lo cual puede ser reflejo de la actividad fijadora de nitrógeno en estos habitats (Tabla 2).

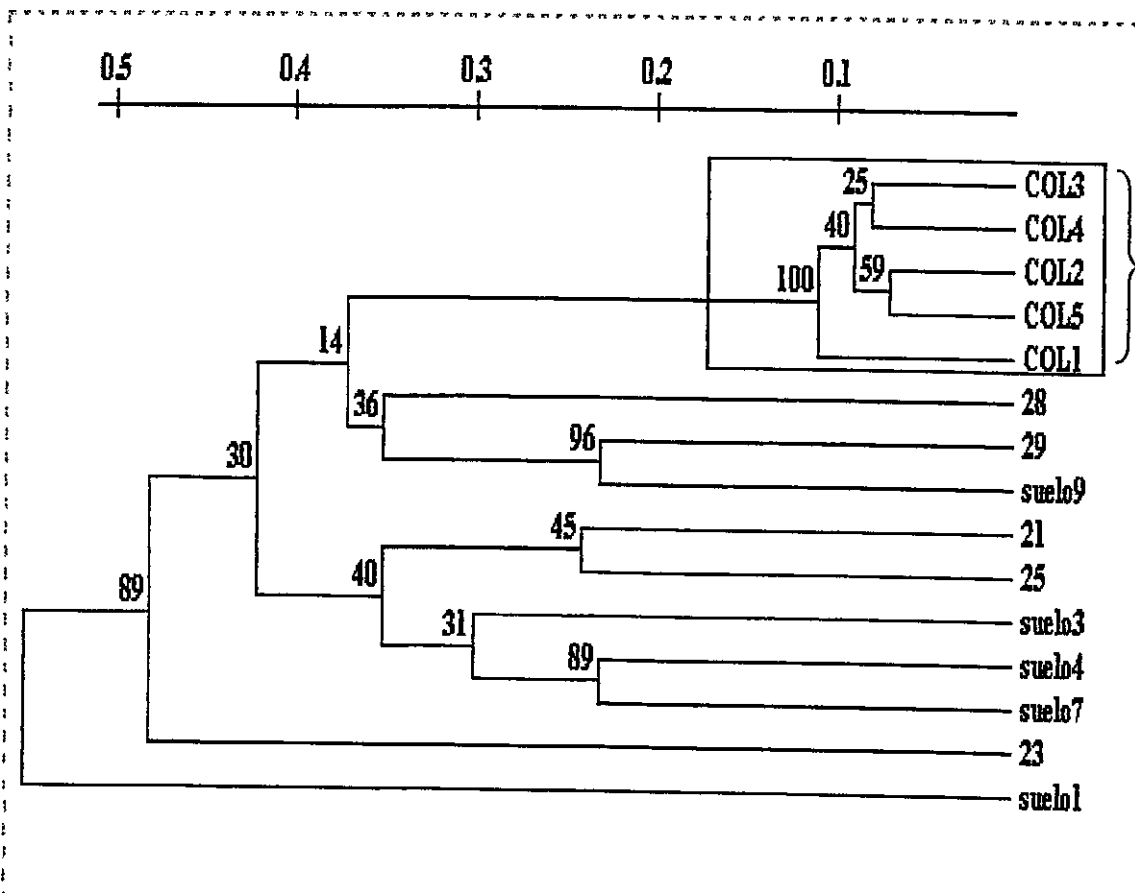


Figura 25. Dendrograma que muestra la relación genética de la comunidad bacteriana total de cada sitio estudiado. El dendrograma se construyó a partir del análisis de distancia por simple matching empleando el algoritmo UPGMA en el programa TREECON.

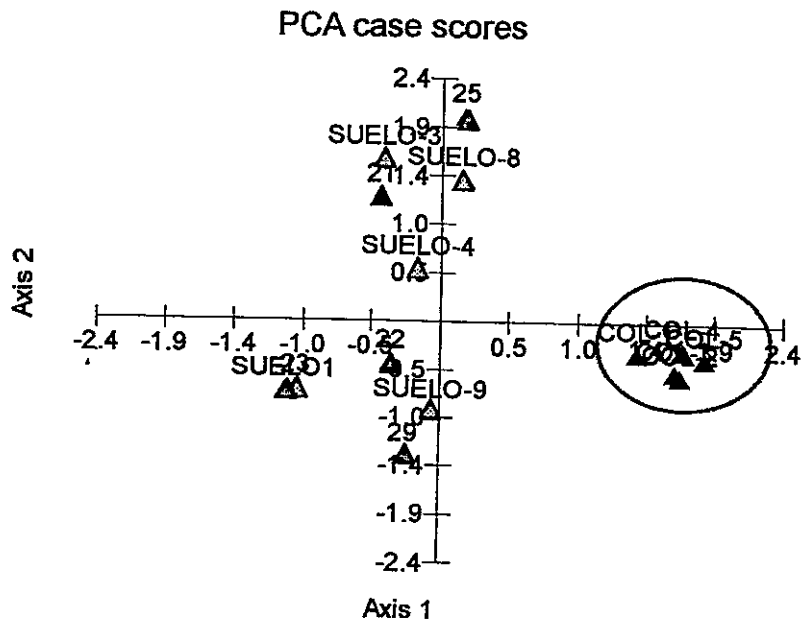


Figura 26. Análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA) de la comunidad microbiana total teniendo en cuenta los valores de TRFs, para confirmar el agrupamiento obtenido por los valores de distancia genética

DISCUSIÓN

1. Diversidad genética en las poblaciones microsimbiontes de *Frankia*.

Una observación común en los estudios de diversidad de los aislados *Frankia* es su baja variabilidad genética. Al menos hay dos causas principales para esta reducida diversidad: i) la selección que se produce durante el proceso de aislamiento que favorece a aquellas cepas más eficientes para el crecimiento en cultivo y ii) el crecimiento lento de la bacteria en cultivo que reduce las posibilidades de obtener un alto número de aislados. Por lo tanto, en los estudios de diversidad genética de *Frankia* es más relevante, que en muchas otras bacterias, acceder a los microorganismos en muestras ambientales y evitar el proceso de aislamiento y purificación de clones.

El uso de técnicas moleculares es una alternativa a los métodos convencionales para proporcionar información acerca de la diversidad de las poblaciones naturales de *Frankia* (Murry *et al*, 1997; Nalin *et al*, 1999; Ritchie y Myrold. 1999; Rouvier *et al*, 1996; Simonet *et al*, 1999). Determinándose marcadores genéticos adecuados para acceder al actinomicete directamente tanto en nódulos como en el suelo (Jeong & Myrold 1999; Nalin *et al* 1999)

Para evaluar el nivel de diferenciación genética entre los microsimbiontes de una planta hospedera y entre diferentes plantas

hospederas de la misma especie, en un área restringida del matorral de Chile central se realizó un análisis directamente en nódulos radiculares colectados de arbustos de *Colletia hystrix* (Rhamnaceae). La combinación de los patrones RFLP-PCR/*Hae*III en las regiones IGS *nif* y *rrn* mostró 15 haplotipos o grupos RFLP-PCR- entre las cepas de *Frankia* infectivas de *Colletia*. Para este análisis se empleó tres enzimas de restricción más, pero no incrementaron el número de haplotipos. Un análisis similar con el espaciador intergénico entre los genes RNAr 16S y 23S empleando 12 enzimas de restricción resultó en sólo cuatro patrones RFLP-PCR- entre los microsimbiontes de *Ceanothus* (Rhamnaceae) (Ritchie & Myrold 1999), lo que sugiere una reducida variabilidad a nivel de los sitios de restricción en el microsimbionte, a un nivel de muestreo regional nuestros datos, en cambio muestran que a nivel local existe un mayor número de haplotipos, validando que los perfiles IGS rrn /*Hae*III e IGS nif /*Hae*III probablemente representan casi toda la diversidad presente en nuestras muestras. Esta afirmación fue corroborada secuenciando el IGS *rrn* del haplotipo común A3 en cada planta hospedera. Todos los haplotipos A3 presentan la misma secuencia indicando que no hay nuevos sitios polimorficos en la IGS rrn . Además el haplotipo A3

coincide con la secuencia IGS *rrn* de la cepa de *Frankia* ChI4 usada como referencia

1.1 Diversidad de microsimbiontes de *Frankia* dentro de un nódulo.

Los patrones PCR-RFLP de los lóbulos derivados de un único nódulo resultaron idénticos esto sugiere que cada nódulo contiene una única cepa o un grupo de cepas genéticamente muy relacionadas. En estudios previos, empleando un análisis similar, en los nódulos de *Casuarina* (Rouvier et al, 1996) y *Myrica* (Clawson y Benson, 1999b) se encontró que siempre éste estaba colonizado por una sola cepa de *Frankia*. Resultados similares también fueron reportados en nódulos inducidos por *Rhizobium* donde no se observan mezclas de cepas asociadas a nódulos individuales (Laguerre, et al. 2003). Hay sólo un reporte en *Frankia* que describe la presencia de más de un microsimbionte asociado a nódulos de *Casuarina* (Redell y Bowen, 1985). La presencia de más de una cepa en un nódulo podría ser el resultado de la alta abundancia de varias cepas altamente infectivas y competitivas en la rizósfera de las plantas hospederas. Por el contrario, si sólo una cepa es la abundante y competitiva en la rizósfera, la mayoría de los nódulos podrían ser colonizados e inducidos por esta cepa dominante.

1.2 Dominancia de un microsimbionte en los nódulos radiculares.

Nuestros resultados muestran que un haplotipo domina la población de nódulos estudiada con una frecuencia promedio del 0,62. En todas las plantas hospederas, el mismo haplotipo tiene la frecuencia más alta con un rango entre 0;26 y 0;82. Similares resultados se observaron en nódulos de *Frankia* de *Alnus incana* y *Myrica pensylvanica*, donde el 72% de las cepas tienen la misma secuencia del DNAr (Clawson y Benson, 1999a). Los estudios de diversidad de cepas aisladas de una planta de *Alnus incana* subsp. *rugosa* mediante electroforesis en geles bidimensionales mostraron que una cepa estuvo presente en un 80% de los nódulos examinados (Benson, 1984). La dominancia de una cepa de *Frankia* también se ha observado en nódulos de *Alnus viridis* (Simonet, 1994). Esto indica que la dominancia de una cepa de *Frankia* es un fenómeno frecuente en la población de microsimbiontes de una planta. La alta frecuencia de una haplotipo en la población del nódulo radicular de una planta podría reflejar la presencia de cepas con alta abundancia y altamente competitivas en la rizósfera. La influencia de la

selección por el hospedero y/o los parámetros edáficos también afectan la vida saprofítica y la competencia en la rizósfera por ocupar el nódulo.

En la simbiosis actinorrónica existe poca evidencia sobre el efecto de estos factores para ocupar el nódulo, principalmente debido a la dificultad del aislamiento de *Frankia* del suelo. Sin embargo, la dominancia de las cepas se ha descrito en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y se ha sugerido que la dominancia de un genotipo particular en nódulos puede ser el resultado de una alta abundancia en el suelo más que una fuerte competencia por ocupar el nódulo (Hartmann, 1998; Velásquez, 1997). Sin embargo, en otro reporte se destaca el efecto de la competencia de cepas rizobiales, donde las cepas dominantes en los nódulos no son necesariamente las que dominan en el suelo (Laguerre, 2003).

1.3 Estabilidad de genotipos y diseminación de clones.

Los microsimbiontes que presentaron el haplotipo A3 fueron los más comunes entre los nódulos de los arbustos estudiados. Este haplotipo también lo posee la cepa ChI4, aislada de nódulos de *C. hystrix* en 1991 (Carú, 1993) en la misma localidad y específicamente de la planta designada como Col-3. Este hallazgo sugiere que este haplotipo es estable en el tiempo. Una observación similar fue hecha por Clawson y Benson, (1999a) quienes

encontraron una cepa dominante en los nódulos de *Alnus* y secuencia nucleotídica parcial para rDNA 16S fue similar a la cepa Cp11 previamente aislada de *Comptonia peregrina* en 1978. En otras especies bacterianas como *E. coli* se ha determinado que ciertos genotipos multilocus que se distribuyen ampliamente, son estables y persisten por varias décadas (Ochman y Selander, 1984).

Nuestros resultados también sugieren que el haplotipo dominante fue capaz de infectar todos los arbustos estudiados y por lo tanto fue capaz de diseminarse en el área de estudio. La dominancia y la diseminación refleja la habilidad de crecer y competir saprofiticamente en la rizósfera y por lo tanto sobrevivir en el suelo. Recientemente Vogel *et al.* (2003), estudiaron la diseminación de *Agrobacterium spp.* Biovar 1 a nivel de microhabitat en un muestreo intenso en 1 cm³ de suelo. Ellos encontraron clones agrobacteriales que se esparcieron al menos 1 cm. Nuestros datos muestran que un clon (haplotipo A3) fue capaz de diseminarse en un área mayor, así por ejemplo las plantas Col-4 y Col-2 que están separadas por aproximadamente de 11 mts aparecen asociadas al mismo haplotipo. La diseminación de clones en el suelo es aún un proceso desconocido en bacterias, el cual podría producirse por un transporte pasivo por el agua, viento, invertebrados u otros agentes.

En *Frankia* no existen estudios al respecto sino observaciones indirectas que muestran que un microsimbionte es capaz de colonizar la mayoría de las plantas que están relacionadas espacialmente.

1.4 Diversidad genotípica de *Frankia* dentro y entre plantas hospederas.

Previos reportes señalan una baja diversidad de *Frankia* en las cepas que habitan nódulos de plantas hospederas. Esta baja diversidad se observa incluso en diferentes escalas de muestreo. Así por ejemplo en cepas de *Frankia* que nodulan plantas hospederas de Casuarinaceae en distintas regiones de Australia, el habitat nativo de estos árboles, se identificaron cinco patrones RFLP-PCR- (Rouvier *et al.* 1996). A una escala mayor, la diversidad de *Frankia* de nódulos de *Casuarina* y *Allocasuarina* colectados en Australia y 11 países distribuidos en tres continentes sólo reveló siete grupos RFLP de *Frankia*, considerando las regiones IGS_{rrn} e IGS_{nif} (Simonet *et al.* 1999). A una escala regional la diversidad de cepas infectivas de *Frankia* en diferentes especies de *Ceanothus* (Rhamnaceae) en 19 sitios de muestreo en Oregon, USA resultó en sólo cuatro perfiles PCR-RFLP para las mismas regiones genómicas (Ritchie y Myrold, 1999). Paralelamente, Jeong y Myrold (1999) secuenciaron 592 bp correspondiente a la región IGS_{rrn} completa y sólo detectaron dos sustituciones de bases entre los simbiontes derivados de dos

copoblaciones de *Ceanothus* en Oregon, USA. En contraste, nuestros resultados muestran que los microsimbiontes de las cinco plantas de *Colletia* que crecen en un en un área reducida de 10 x 5 m presentan 15 haplotipos RFLP-PCR- indicando una mayor diversidad genética que la reportada previamente. Una explicación a este hallazgo puede ser que nuestro muestreo se hizo en nódulos de plantas que están creciendo en su habitat nativo y por lo tanto ambos miembros de la simbiosis podría tener mayor variabilidad genética. Otros estudios sugieren que cuando la planta es introducida se presenta una reducida diversidad genética. Es así, que cuando se analizó microsimbiontes de nódulos de *Casuarina* en su habitat natural en Australia estos exhibían mayor diversidad que los microsimbiontes derivados de nódulos colectados de *Casuarina* que crecen fuera del habitat nativo, presentando el mismo haplotipo. (Simonet, 1999). Cabe mencionar que en esta tesis, las plantas fueron muestreadas exhaustivamente y se identificaron todos los nódulos presente en cada una ellas, este mayor esfuerzo de muestreo puede dar cuenta también de la mayor diversidad observada.

Cuando analizamos a los microsimbiontes asociados a cada planta hospedera la diversidad genética intragrupo (microsimbiontes de una planta), basada en la frecuencia de dos los loci fue variable, así por ejemplo se encontró una alta

diversidad genética en los microsimbiontes presentes en las plantas Col-4 y Col-5 ($H=0,674$ y $0,616$, respectivamente), pero en las plantas Col-2 y Col-3 el valor fue casi la mitad ($H=0,231$ y $0,121$, respectivamente). Sin embargo, el promedio de la diversidad genética para toda la población microsimbionte fue de $0,51$, encontrándose en el rango estimado para las poblaciones bacterianas reportadas con una alta diversidad genética (Bernhard, 1998). El nivel de la diversidad genética dentro del grupo fue también estimada mediante el coeficiente de distancia genética basado en la frecuencia de cada banda donde se observó la misma tendencia (Tabla 4).

La presencia de microsimbiontes con haplotipos únicos en las diferentes plantas indica la existencia de diferenciación genética entre los grupos microsimbiontes. Los datos muestran que se logró determinar tres grupos genéticamente diferenciadas entre los microsimbiontes de *Frankia*, lo que sugiere un posible aislamiento espacial de los microsimbiontes asociadas con diferentes plantas, excepto para el haplotipo A3. Curiosamente, la mayoría de los microsimbiontes asociadas con las plantas Col-4 y Col-5 se relacionan estrechamente debido a que conforman los clusters I y III, respectivamente en el dendrograma (Fig 10).

Una importante variación genética se detectó en los microsimbiontes dentro de algunos grupos (intra-planta) comparada con la variación entre grupos (interplanta) (Tabla 5). En contraste, los estudios en los microsimbiontes de *Frankia* en tres especies de *Ceanothus* mostró que la diversidad de los microsimbiontes dentro de cada población fue menor que la diversidad entre poblaciones, lo que los llevó a sugerir que en la divergencia de microsimbiontes de *Frankia*, la separación geográfica es más importante que la influencia de la planta hospedera (Jeong y Myrold, 1999), aunque el sitio muestreado en este análisis abarcó kilómetros. En contraste, las muestras se colectaron en un área de 5x10 mts y representan una menor escala de muestreo, donde la migración o diseminación de clones, discutidas anteriormente, pueden afectar la diversidad de las poblaciones.

Otros factores pueden además estar involucrados en la diversidad y la estructura genética de poblaciones microsimbiontes, como son el efecto de la planta hospedera, la competencia por ocupar el nódulo, la sobrevivencia en el suelo y los factores edáficos. Existe evidencia que algunas cepas de *Frankia* se distribuyen de acuerdo a la elevación de un área geográfica, pero no se ha demostrado una clara correlación con la taxonomía del hospedero o distribución geográfica (Ritchie y Myrold, 1999). En esta tesis, los valores de

algunos parámetros edáficos como el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio no parecen estar relacionado con la diversidad genética de los tres grupos identificados (Tabla 2) . Aunque en un reporte previo se encontró una relación entre pH y el tipo de *Frankia* que habita nódulos de *Elaeagnus* (Jamann, 1992). En nuestro caso el pH fue igual entre los sitios muestreados. Sin embargo, se observó una tendencia entre una alta diversidad de la población (por ejemplo, Col-4 y Col-5) con un bajo contenido de nitrógeno y materia orgánica, aunque esta relación no fue significativa. En los estudios con microsimbiontes de *Ceanothus* (Murry, 1997) y de *Elaeagnus* (Jamann, 1992) se ha sugerido que las diferencias en la poblaciones de *Frankia* son una función del ambiente más que un efecto de la planta hospedera. Mientras que en otros reportes se sugiere que la distribución de las cepas de *Frankia* puede ser el resultado de adaptaciones a microclimas locales (Clawson y Benson, 1999a, Clawson y Benson, 1999b). Los datos en esta tesis no muestran diferencias significativas en los parámetros edáficos de los sitios de muestreo, por lo que sugerimos que la planta hospedera puede ser un importante factor biótico que determina la estructura genética de las poblaciones de *Frankia* en los nódulos. Por otro lado, si en una planta hospedera hay microsimbiontes con diversos haplotipos (por ejemplo Col-4) esto puede deberse a una mayor

diversidad genética de las bacterias en el suelo con igual capacidad de competir para ocupar el nódulo ó que la planta hospedera es más promiscua y por lo tanto acepta fácilmente diferentes microsimbiontes.

Aunque en nuestro análisis no encontramos relación entre la distancia genética con la separación geográfica de los cinco grupos de microsimbiontes, la diversidad genética de cada población parece guardar una relación con la distribución espacial de las plantas (Fig 12). Los valores de diversidad genética están ordenados en un gradiente que coincide con la distribución espacial de las plantas. La topología del dendrograma de los grupos de microsimbiontes de *Frankia* derivados de cada planta también representó esta distribución espacial de las plantas hospederas. Sin embargo, deberíamos considerar que los resultados observados corresponden a un progresivo proceso de infección. Por lo tanto, la actual diversidad observada entre microsimbiontes puede ser el resultado de múltiples eventos de infección separados en el tiempo y el espacio y dependiente de la habilidad de diseminación de las cepas.

1.4 Estructura genética de la población microsimbionte.

Las poblaciones naturales de las bacterias se consideran como clonales debido a que su multiplicación ocurre por fisión binaria. Sin embargo,

dependiendo del grado de intercambio genético que ocurre entre las bacterias, la estructura genética de las poblaciones bacterianas pueden llegar a ser panmíticas (Maynard-Smith, 1993). Bajo una hipótesis de asociación al azar en las regiones genómicas estudiadas, se esperaría una mayor diversidad de haplotipos. Sin embargo la diversidad genética de nuestras poblaciones está organizada en un reducido número de haplotipos indicando una asociación no al azar y por lo tanto concordando mejor con una estructura clonal de la población. Así, por ejemplo en la población Col-1 se encontraron sólo dos haplotipos (A3 y G8) y los haplotipos recíprocos G3 y A8 estaban ausentes. La escasez de algunos haplotipos de los esperados en una libre recombinación, sugiere que la estructura de las poblaciones microsimbiontes de *Frankia* puede ser clonal como en el caso de las bacterias patogénicas. Los estudios de genética de poblaciones en *E. coli* mediante análisis de electroforesis enzimática multilocus han revelado que estas poblaciones poseen una alta diversidad, pero esta diversidad está organizada en un número limitado de clones genéticamente distintos (Caugant, *et al.* 1981; Hartl y Dykhuizen, 1984; Whittam *et al.* 1983). Los estudios con *Pseudomonas stutzeri* (Rius *et al.* 2001), *Serratia marcescens* (Gargallo-Viola, 1989) y *Salmonella spp* (Selander *et al.*, 1990) también encontraron que la

estructura de las poblaciones de estas bacterias es fuertemente clonal. Por otra lado O'Rourke & Stevens, (1993) demostraron que las poblaciones de *Neisseria gonorrhoeae* exhiben una asociación al azar de los alelos en los diferentes loci, indicando que estas poblaciones pueden ser consideradas más bien como unidades panmíticas. Resultados similares fueron reportado por Souza *et al.* (1992) en el análisis de la estructura genética de *Rhizobium leguminosarum*.

En el caso de *Frankia*, varios reportes realizados a escala local, regional o global muestran que en microsimbiontes de *Casuarina*, *Allocasuarina* (Simonet *et al.* 1999; Pérez *et al.* 1999; Rouvier *et al.* 1996), *Ceanothus* (Jeong y Myrold, 1999; Ritchie, y Myrold, 1999) y *Elaeagnus* (Nalin *et al.* 1999) presentan una baja diversidad con un reducido número de clones, concordando con la hipótesis de una estructura clonal en las poblaciones microsimbiontes.

2. Diversidad genética de *Frankia* en el suelo.

2.1 Densidad de la población de *Frankia* en el suelo.

La aplicación de la técnica del NMP-PCR para cuantificar las poblaciones del suelo de *Frankia* en la rizósfera de las plantas de *C. hystrix*, no-actinorrícicas y en suelo sin cobertura vegetal.

Aunque la menor abundancia de *Frankia* se observó en el suelo sin cobertura vegetal (5×10^4 y 6×10^4 genomas/g de suelo en octubre y abril, respectivamente) (Fig 14B), estos valores se encuentran en el rango de previas cuantificaciones de *Frankia* en el suelo, donde se estiman entre $0,2 \times 10^4$ y $0,9 \times 10^5$ genomas de *Frankia* por gramo de suelo (Picard *et al.* 1992 Myrold y Hus-Danell, 1994). Sin embargo, el número de UGs que obtuvimos fue mayor que las unidades de nodulación reportados por Van Dijk *et al.* (1988), los cuales se estimaron entre $1-2 \times 10^3$ unidades de nodulación/g de suelo mediante el bioensayo plant-trapping.

En la comparación del método NMP-PCR con métodos convencionales de cuantificación de bacterias, los genomas de la bacteria de *K. pneumoniaea* determinados como UGs fueron un orden de magnitud mayor que el de células viables, esto indica que la cuantificación por el NMP-PCR resulta ser adecuado cuando se desea estimar la abundancia de *Frankia* en el suelo. Sin embargo, este sistema de cuantificación posee limitaciones, por que el número de UGs que obtuvimos fue casi la mitad que el número de células totales observadas en el microscopio, esto se debe probablemente a la dificultad de lisar estructuras como las esporas y las hifas, ya que *Frankia* es considerado un organismo refractario a la lisis celular; así mismo muchas

células de *Frankia* por su naturaleza filamentosa queden adheridas o absorbidas entre las partículas del suelo, disminuyendo el rendimiento en la extracción del DNA.

A pesar que los muestreos se realizaron en dos épocas diferentes (en octubre y en abril), la abundancia de *Frankia* asociada a la rizósfera de *C. hystrix* permaneció invariable con un número de $5,6 \times 10^6$ UGs por gramo de suelo (Fig. 14B). El análisis químico del suelo muestra que en la rizósfera de estas plantas actinorrísticas hay un mayor contenido de micronutrientes especialmente nitrógeno, lo que podría ser consecuencia de la actividad fijadora de nitrógeno en vida libre de *Frankia*. La abundancia estimada de *Frankia* asociada a la rizósfera de plantas no actinorrísticas fue de $3,4 \times 10^5$ y $1,9 \times 10^5$ en los meses de octubre y abril, respectivamente. Los exudados de las raíces pueden ser un aporte importante de fuente de energía para mantener las poblaciones de *Frankia* en la rizósfera de las plantas hospedadas y no-hospedadas. Sin embargo, El número de UGs en la rizósfera de las plantas no-hospedadas fue menor que le presente en la rizósfera de *C. hystrix*. Resultados similares se obtuvieron cuando se compararon las unidades de nodulación de *Frankia* presentes en suelos de *Alnus* spp (1×10^5 UN/cm³) con las de plantas no hospedadas (3×10^3 UN/cm³ de suelo) (Somolander y

Sundman, 1987; Van Dijk *et al.* 1988). Joen y Myrold, (2001) determinaron por ensayos de planta-trapping que la población de *Frankia* en suelos de *Ceanothus velutinus* fue 10 veces mayor que en suelos con plantas no-hospederas. Sin embargo en los estudios de cuantificación de *Frankia* realizados por Smolander, (1990) en la rizósfera de plantas no hospederas de abedules se encontró entre 5×10^2 y $6,5 \times 10^3$ UN/cm³ de suelo, este valor fue igual e incluso en algunos casos llegó a ser mayor que el obtenido en suelos de plantas hospederas de *Alnus* spp. Existen ciertos factores que pueden influenciar las fluctuaciones en el número de las poblaciones bacterianas asociadas a la rizósfera de las plantas, así por ejemplo Smith, (1976) determinó que en las plantas de *Betula alleghaniensis* hay un contenido elevado de ácidos orgánicos como acetato, que es una fuente de carbono importante para *Frankia*, esto explicaría el mayor número de la población de *Frankia* asociada a la rizósfera de estas plantas no-hospederas. Otro factor que se debe considerar es la composición florística, en los estudios de Paschke y Dawson, (1992), en plantas de *Betula nigra* y otras plantas no-actinorrícicas encontraron que este factor fue un modulador importante en la densidad de *Frankia* presente en el suelo de estas plantas.

Las características del suelo también influyen en la abundancia de *Frankia* en el suelo, el pH ejerce una alta influencia en la densidad de *Frankia* en el suelo encontrando un rango óptimo de crecimiento cercano a la neutralidad (Smolander y Sarsa, 1990), esto explicaría la alta densidad de *Frankia* en la rizósfera de las plantas hospederas, no-hospederas y en los suelos de los alrededores sin cobertura vegetal, en todos estos sitios el pH determinado fue alrededor de 7.0 (Tabla 2).

2.2 Riqueza genética de *Frankia* en el suelo.

Para analizar la diversidad genética de *Frankia* en el suelo, no se consideró el aislamiento de esta bacteria debido a la dificultad que ofrece este proceso. En ecología molecular, los estudios de poblaciones generalmente se basan en la estimación de las diferencias genéticas entre los individuos o grupos de individuos. Para estos análisis es apropiado emplear una técnica que permita determinar gran parte de la variación nucleotídica en los marcadores moleculares empleados, como los patrones del SSCP. En estudios previos basados en el análisis por SSCP se determinó la estructura genética de las comunidades de bacterias y de hongos, empleando las moléculas RNAr 16S y 18S, respectivamente como indicadores de diversidad (Koschinsky *et al.* 1999; Peters *et al.* 2000). Sin embargo, cuando analizamos el fragmento de 189

pb del DNAr 16S sólo obtuvimos dos genotipos SSCP en la población de *Frankia* en el suelo, revelando la ausencia de polimorfismo en este fragmento. Cuando las muestras se analizaron utilizando como marcador la región IGS rnm se detectó una mayor variabilidad, determinándose nueve genotipos SSCP, aunque en general la diversidad genética observada en los tres habitats fue reducida. Resultados obtenidos por Sunnucks *et al.* (2000), indican que en los análisis SSCP de la región IGS rnm en la poblaciones naturales de *Frankia*, revelan mayor polimorfismo que en los genes ribosomales, Niveles reducidos de variabilidad también se han encontrado utilizando Plant-trapping para rescatar la población de *Frankia* del suelo, en este ensayo Nalin *et al.* (1997) observó la presencia de siete perfiles PCR-RFLP *nif-HaeIII* en la población infectiva de *Elaeagnus*, cuya distribución varió con la profundidad del suelo.

Por otra parte, los resultados indican que existe una mayor riqueza de genotipos ($H=1,59$) en el suelo sin cobertura vegetal con una baja densidad de bacterias de *Frankia*, de acuerdo a lo estimado por el NMP-PCR, contrariamente, en la rizósfera de las plantas hospederas se determinó un baja riqueza genética (con un índice de Shannon (H)=0,95 y una alta densidad de bacterias de *Frankia*. Es así que los resultados muestran que de los nueve genotipos SSCP determinados, cinco de ellos estaban presentes en el suelo sin

cobertura vegetal la baja riqueza de genotipos SSCP obtenidos en la rizósfera de *C. hystrix* parece un resultado inesperado, debido a que la rizósfera se considera un habitat que favorece el crecimiento microbiano. Dos explicaciones puede dar cuenta de este hallazgo i) una mayor competencia heterotrófica en la rizósfera debido a la mayor abundancia de microorganismos que favorece a algunos genotipos y por la tanto hay una reducción de la riqueza y ii) un efecto de selección por parte de la planta hospedera que podría estar mediado por las señales químicas de reconocimiento bacteria-planta que favorece a los genotipos más infectivos. Este último sería consistente con la hipótesis que establece que la presencia de una cepa dominante en la población microsimbionte sería consecuencia del efecto de selección ejercido por la planta hospedera.

Asimismo, el valor intermedio de la diversidad genética ($H=1,33$) encontrada en la rizósfera de las plantas no-hospederas sugiere que la competencia saprofítica es una explicación posible para los datos, ya que en este habitat no hay efecto de la planta hospedera.

Otro aspecto relevante de destacar es que, al igual que en las poblaciones microsimbiontes, en las poblaciones de vida libre se detectó la presencia de un genotipo compartido con la cepa ChI4 en los tres sitios

muestreados. Similares resultados fueron obtenidos por Joeng y Myrold, (2001) cuando compararon la población de *Frankia* asociada a la rizósfera de *Ceanothus velutinus* (Rhamnaceae) con otras plantas hospederas, ellos encontraron un grupo rep-PCR común a los dos sitios y cepas únicas para cada sitio.

3. Estructura genética del gremio fijador de nitrógeno.

La evaluación de la diversidad genética de las bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó mediante la caracterización genética de pools del gen *nifH* en los tres sitios muestreados.

La combinación de los TRFs obtenidos por las enzimas *HaeIII*, *MspI*, y *RsaI* permitió identificar algunas bacterias como pertenecientes al genero *Frankia* sp correspondiente a los fragmentos 262*HaeIII*, 23*MspI* y 46*RsaI* y al grupo de bacterias rizobiales (179*HaeIII*, 23*MspI* y 46*RsaI*) entre otras. Se construyó una base de datos a partir de las secuencias reportadas por el GenBank, sin embargo, muchos TRFs permanecieron sin identificar. De forma similar se han descrito un gran número de secuencias desconocidas, las cuales corresponden a diversos diazótrofos sin identificar (Shaffer *et al.* 2000; Scala y Kerkhof, 2000).

El gremio fijador de nitrógeno presente en el suelo sin cobertura vegetal se distinguió del asociado a las rizósferas en el análisis de los perfiles de los pools génicos del *nifH*. Estos resultados fueron confirmados con el análisis de distancia genética realizado por simple matching en el dendrograma de la Fig 21, donde el cluster III agrupó todas las muestras de suelo con un alto valor de bootstrap. Los patrones TRFs se compararon empleando el análisis PCA para estimar la relación entre los grupos *nifH* identificados en los tres sitios y confirmó los resultados obtenidos en el agrupamiento. Poly *et al.* 2001 evaluó la estructura de pools de genes *nifH* en seis tipos de suelo y determinaron que la composición de las comunidades diazotróficas difieren en gran medida en una gran escala (entre suelos) y a una microescala (entre micro-ambientes de un tipo de suelo). Muchos reportes indican la influencia de las propiedades físicas y químicas del suelo en la actividad diazotrófica (Riffkin *et al.* 1999). Los resultados obtenidos sugieren que las diferencias en la estructura del gremio fijador de nitrógeno entre los tres sitios analizados pueden ser explicadas en parte por los factores edáficos tales como el contenido de nitrógeno, el fósforo y el contenido de materia orgánica que son significativamente mayores en las rizósfera de las plantas hospederas. La cantidad total de nitrógeno inorgánico en la rizósfera

de las plantas de *C. hsytrix* fue de $30,4 \pm 6,77$ y estas plantas presentan la mayor diversidad de bacterias diazotrópicas con un $H=1,53$, mientras que en la rizósfera de las plantas no-actinorrícicas la diversidad fue de $1,46$, con un contenido de nitrógeno de $21,8 \pm 8,79$ y en el suelo sin cobertura vegetal la diversidad fue de $1,43$ y un contenido de nitrógeno de $23,4 \pm 17,8$. La abundancia de las poblaciones de *Frankia*, es mayor en la rizósfera de las plantas hospederas con un $13,5\%$, seguido de un $6,7\%$ en la rizósfera de plantas no hospederas y $0,34\%$ en el suelo sin cobertura vegetal, esto nos indica que el contenido de nitrógeno puede ser un importante factor que esta modulando la estructura de las comunidades diazotópicas y a la abundancia de las poblaciones de *Frankia* en el área analizada. Sin embargo, varios reportes indican que la actividad y abundancia de las bacterias diazotrópicas totales o de poblaciones específicas puedan estar influenciadas en forma negativa por el nitrógeno inorgánico. Así por ejemplo Peoples *et al.* (1992) determinó que el amonio y el nitrato inhiben a la enzima nitrogenasa, aún en bajas cantidades. Herridge y Brockwell, (1989), reportaron que el contenido de nitrato también esta relacionado negativamente con el número de diazótrofos. Sin embargo, los datos obtenidos en esta tesis indican, que el contenido total de nitrógeno podría estar relacionado con la diversidad de

diazótrofos, lo cual es independiente de la actividad de fijación de nitrógeno que esta regulada por nitrógeno combinado.

Por otra parte, Bardgett *et al.* (1999) ha sugerido que la especie vegetal define un microhabitat que afecta mayoritariamente la estructura de la comunidad fijadora de nitrógeno más que las propiedades fisico-químicas del suelo. Esto explicaría por que en el dendrograma el gremio de diazótrofos del suelo forman un grupo independiente (cluster III), lo que indica que la rizósfera define un microhabitat claramente distinto del suelo y por lo tanto podría ser el factor determinante en la estructura y diversidad de las bacteria fijadoras de nitrógeno y en la abundancia relativa de *Frankia* dentro del gremio de diazótrofos.

4. Diversidad genética de la comunidad bacteriana total.

De acuerdo a nuestros resultados encontramos que el análisis del fragmento del DNAr 16S permitió detectar cambios en la estructura de la comunidad bacteriana asociada a la rizósfera de las plantas hospedadas de *Frankia*, no-hospedadas y en suelo sin cobertura vegetal. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la comunidad bacteriana del suelo sin cobertura vegetal presenta un menor número de TRFs que la asociada a las rizósferas. La comunidad bacteriana asociada a la rizósfera fue dominada

principalmente por cuatro ribotipos, el tamaño de estos (209_{forward} y 71_{reverse}; 224f y 125r; 198f y 305r; 41f y 123r) coincidió con la especies de *Frankia*, el grupo de bacterias rizobiales, *Desulfovibrio sp* y *Halomonas sp*, respectivamente. Mientras que en el suelo sin cobertura vegetal los ribotipos dominantes (39f y 125r; 39f y 124r) se identificaron como *Pseudomonas sutzeri* y *Xanthomonas campestris*.

Aunque la intensidad de fluorescencia no es una medida estricta de abundancia, ésta puede ser una buena aproximación cuando se comparan muestras ambientales. Es así como los resultados obtenidos corroboran que las mayores abundancias se encuentran en la rizósfera. Estas observaciones indican que existen diferencias tanto en la composición y la abundancia de las poblaciones asociadas a la rizósfera y al suelo sin cobertura vegetal. En los estudios de Smalla *et al.* (2001) mediante análisis DGGE también se detectó diferencias significativas entre las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de frutilla, canola ó papa con las comunidades del suelo.

En los estudios ecológicos se establecen que la riqueza y la abundancia de las comunidades biológicas reflejan la presión que ejerce el tipo de rizósfera que moldea la diversidad en las comunidades. Así por ejemplo una mayor riqueza y abundancia de ribotipos fue observada en la rizosfera de *C.*

hystrix, mientras que cuando analizamos estos parámetros en la rizósfera de las plantas no actinorrícicas vario de una especie de planta a otra. Esto nos indica que diferentes especies de plantas seleccionan distintas comunidades bacterianas. Nuestros resultados están acordes con los hallazgos reportados por Smalla *et al.* (2001), quienes encontraron que las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de canola y papa fueron similares, pero diferentes a las de frutilla. Del mismo modo Schweiger y Tebbe, (2000) reportaron diferencias en los perfiles SSCP del DNAr 16S entre *Album* y *Medicago sativa*. Finalmente Berg *et al.* 2002 sugieren que la rizósfera de cada especie de plantas proporciona condiciones especiales que seleccionan cierto tipo de cepas.

Por otra parte, se comparó la composición de las comunidades bacterianas presentes en los tres sitios empleando la medida de distancia genética de Jaccard de los perfiles T-RFLP del DNAr 16S. En el dendrograma de la Fig 25, únicamente las comunidades asociadas a la rizósfera de *C. hystrix* formaron un grupo. La rizosfera de las plantas hospederas proporcionan condiciones similares que favorecerían el desarrollo de comunidades bacterianas más homogéneas, mientras que las diferentes especies de plantas no-actinorrícicas proporcionan habitats específicos debido

a un crecimiento radicular con condiciones espaciales a cada especie de planta que puede alterar las condiciones locales del suelo y así contribuir a las diferencias observadas en las comunidades microbianas asociadas. Normander y Prosser, (2000), determinaron que la superficie de la raíz y la liberación de exudados ricos en aminoácidos y azúcares influyen en la composición de las comunidades bacterianas de la rizósfera. Así mismo, Meschner *et al.* (2001) reportaron que la especie de la planta, la zona de la raíz y el tipo de suelo influyen en la comunidad microbiana de la rizósfera. Sin embargo de acuerdo a nuestros resultados, las comunidades microbianas que se encuentran en el suelo sin cobertura vegetal estarían influenciadas principalmente por las características edáficas, de acuerdo a los estudios de Yang y Crowley, (2000) y Wieland *et al.* (2001) quienes han sugerido que las diferencias en las comunidades microbianas dependen del tipo de suelo (estructura del suelo, la humedad y el contenido de materia orgánica).

A pesar que esta tesis abre una luz en el conocimiento del comportamiento de las poblaciones naturales de *Frankia* en los distintos niveles de organización ecológica, muchas preguntas permanecen por ser resueltas acerca de la estructura y ecología de las poblaciones de *Frankia*. Estudios adicionales que consideren otra áreas de muestreo o acceder a la

población del suelo mediante plant-trapping podría revelar mayores niveles de diversidad genética de *Frankia*. Así mismo una aproximación metagenómica de la diversidad del suelo podría dar cuenta por ejemplo de filotipos predominantes o de nuevos filotipos en la rizósfera actinorrícica.

CONCLUSIONES

1. En la población microsimbionte se determinó 15 haplotipos o grupos RFLP-PCR, con un haplotipo (A3) común y dominante (0,62) que es compartido con la cepa ChI4 y confirmado por secuencia.
2. Los 14 haplotipos restantes son únicos de los microsimbiontes asociados a cada planta hospedera, es decir son privativos.
3. En la población microsimbionte se distinguieron al menos tres grupos de *Frankia* genéticamente diferenciadas de *Frankia* y con una estructura clonal.
4. En la población de *Frankia* del suelo, existe mayor número de unidades genómicas en el suelo rizosférico de las plantas actinorrícicas que en los otros dos habitats estudiados.
5. La población de *Frankia* del suelo esta definida por 9 perfiles SSCP, el perfil observado en la cepa ChI4 (G1) se encontró en ambas rizósferas y en el suelo.
6. Se detectó menos riqueza genética en la población actinomicete que en la población microsimbionte.
7. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se agruparon de acuerdo al habitat: rizosfera de planta hospedera, no-hospedera y suelo sin cobertura vegetal. La

composición química del suelo y la influencia de la rizósfera explicarían estas diferencias.

8. *Frankia* es un grupo funcional significativo en la rizósfera de las plantas hospederas, mientras que en el suelo se reduce su abundancia relativa.

9. Las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de las plantas hospederas son las más homogéneas entre sí .

REFERENCIAS

- Akkermans, A.D.L.; D Hahn, y M. S. Mirza. 1991. Molecular ecology of *Frankia*: advantages and disadvantages of the use of DNA probes. *Plant. Soil* 137: 49-54.
- Altschul, S.F., W. Gish., W. Miller., E. W. Myers, y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Arveby, A.S, y K. Huss-Danell. 1988. Presence and dispersal of infective *Frankia* in peat and meadow soils in sweden. *Biol. Fert. Soils*: 39-44.
- Baker, D y D. Ó'Keefe. 1984. A modified sucrose fraction procedure for the isolation of Frankiae form actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant. Soil.* 78: 23-28.
- Baker, D. D. 1987. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plant* 70:245-248.
- Baker, D. D., y C. R. Schwintzer. 1990. Actinorhizal symbioses, p. 259-292. *In* G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), *Biological nitrogen fixation*, Chapman and Hall, New York.
- Baker, D. D., and B. C. Mullin. 1994. Diversity of *Frankia* nodule endophytes of the actinorhizal shrub *Ceanothus* as assessed by RFLP patterns from single nodule lobes. *Soil Biol. Biochem.* 26:547-552.
- Bardgett, R. D., J. L. Mawdsley, S. Edwards, P. J. Hobbs, J. S. Rodwell, y W. J. Davies. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of template upland grasslands. *Funct. Ecol.* 13:650-660.
- Benoit, L.F., y A. M. Berg. 1990. Methods for production and use of actinorhizal plants in foresty, low-maintenance landscapes and revegetation. *En The biology of Frankia and actinorhizal plants*, pp 281-297. Edited by L. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema. Acad Press Inc. San Diego.
- Benson, D. R., S. E. Buchholz, y D. G. Hanna. 1984. Identification of *Frankia* strains by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:489-494.

- Benson, D. R. 1988. The genus *Frankia*: Actinomycete symbionts of plants. *Microbiol. Sci.* 5:9-12.
- Benson, D. R., y W. B. Silvester. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57:293-319.
- Benson, D.R., D.W. Stephens, M.L. Clawson, y W.B. Silvester. 1996. Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumose*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2904-2909.
- Benson, D. R., y M. L. Clawson. 2000. Evolution of the actinorhizal plants symbiosis, p. 207-224 *In* E. W. Triplett (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, a. Zock, y K. Smalla. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3328-3338.
- Bernhard, H., M. Travisano., P. B. Rainey, y R. R. Hudson. 1998. Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. *Genetics.* 150:1341-1348.
- Berry, A. M. 1994. Recent developments in the actinorhizal symbioses. *Plant Soil.* 11; 135-145.
- Bloom, R. A., M. P. Lechevalier., y R. L. Tate III. 1989. Physiological, chemical, morphological, and plant infectivity characteristics of *Frankia* isolates from *Myrica pensylvanica*: correlation to DNA restriction patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2161-2166.
- Bosco, M., E. Lumini, y P. Normand. 1996. PCR-RFLP direct fingerprinting of culture *Frankia* microsymbiont from *Dryas drummondii* nodules. *Annu. Microbiol. Enzimol.* 46:115-123.

- Burke, D. J., E. P. Hamerlynck, y D. Hahn. 2002. Interactions among plant species and micro-organisms in salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1157-1164.
- Callaham, D., W. Newcomb, y J. G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science.* 199:899-902.
- Carrasco, A., J. Schwenke, y M. Carú. 1992. Isolation of *Frankia* from nodules of *Trevoa trinervis*: ultrastructural characterization. *Can. J. Microbiol.* 38:174-180.
- Carú, M., M. Abarzu'a, y A. Carrasco. 1990. Estructura fina de *Frankia*, cepas Ch11 y Ch12 aisladas de *Colletia hystrix* (Clos). *Acta Microbiol.* 3:55-62.
- Carú, M. 1993. Characterization of native *Frankia* strains isolated from Chilean shrubs (Rhamnaceae). *Plant Soil.* 157:137-145.
- Carú, M., G. Mosquera, L. Bravo, R. Guevara, D. Sepulveda, y A. Cabello. 2003. Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the Rhamnaceae family on different actinorhizal plants. *Plant Soil.* 251:219-225.
- Caugant, D. A., B. L. Levin, y R. K. Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *Escherichia coli* population of a human host. *Genetics.* 98:467-490.
- Clawson, M. L., M. Carú, y D. R. Benson. 1998. Diversity of *Frankia* strains in root nodules of plants from the families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3539-3543.
- Clawson, M. L., y D. R. Benson. 1999a. Dominance of *Frankia* strains in stands of *Alnus incana* subsp. *Rugosa* and *Myrica pensylvanica*. *Can. J. Bot.* 77:1203-1207.
- Clawson, M. L., y D. R. Benson. 1999b. Natural diversity of *Frankia* in actinorhizal root nodules from promiscuous hosts in the Myricaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4521-4527.

- Cocharan, W. G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. *Biometrics*. 105: 116.
- Cohan, F. M. 1994. Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends. Ecol. Evol.* 9:175-180.
- Cournoyer, B., y P. Normand. 1994., Characterization of a spontaneous thiostrepton-resistant *Frankia alni* infective isolate using PCR-RFLP of *nif* and *glnII* genes. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 553-559.
- Dawson, J. O. 1990. Interactions among actinorhizal and associated plant species, p. 299-316. *In* C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (ed.), *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic Press, Inc. California.
- Dawson, J.O., D.G. Kowalski, y P. J. Dart. 1989. Variation with soil depth, topographic position and host species in the capacity of soils from an Australian locale to nodulate *Casuarina* and *Alloscasuarina* seedlings. *Plant. Soil.* 118: 1-11.
- Dong-Hun, L., Z. Yuong-Gun., y K. San-Jong. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR- Single Strand- Conformation Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3112-3120.
- Dunbar, j., S. Takala., S. M. Barns. J. A. Davis, y C. R. Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1662-1669.
- Entcheva, P., W. Liebl, A. Johann., T. Hartsch., y W. R. Streit. 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:89-99.
- Felsenstein J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reability. *Annu. Rev. Genet.* 22:521-565.
- Fernandez, M.P., H. Meugnier., P. A. D. Grimont, y R. Bardin. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 424-429.

Fisher, M .M., y E. W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4630-4636.

Gargallo-Viola, D. 1989. Enzyme polymorphism, prodigiosin production and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* 27:860-868.

Gauthier D, H. G Diem, y Y. Dommergues. 1981. Infectivité et effectivité des souches de *Frankia* isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia* et hippophaë rhamnoides. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 293:489-491.

Gower, J. C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika.* 53:325-338.

Griffiths, A. P., y L.H. McCormick. 1984. Effects of soil acidity on nodulation of *Alnus glutinosa* and viability of *Frankia*. *Plant. Soil.* 79:429-434.

Guevara, R., J. J. Armesto., y M. Carú. 2002. Genetic diversity of *Nostoc* microsymbionts for *Gunnera tinctoria* revealed by PCR-STRR fingerprinting. *Microb. Ecol.* 44:127-136.

Guttman, D. S., y D. E. Dykhuizen. 1994. Detecting selective sweeps in naturally occurring *Escherichia coli*. *Genetics* 138: 993-1003.

Hahn, D., M.P. Lechevalier, A. Fischer, y E. Stackbrand. 1989. Evidence for a close phylogenetic relationship between members of the genera *Frankia*, *Geodermatophilus*, and "*Blastococcus*" and emendation of the family Frankiaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 11:236-242.

Hahn, D., M. J. C. Starrenburg, y A. D. L. Akkermans. 1990. Oligonucleotide probes that hybridize with rRNA as tools to study *Frankia* strains in root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1.342-1.346.

Hahn, D., R. I. Amann, W. Ludwig, A. D. L. Akkermans, y K. H. Schleifer. 1992. Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with

rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 138:879-887.

Hahn, D., K. Zepp, y J. Zeyer. 1997. Whole cell hybridization as a tool to study *Frankia* populations in root nodules. *Physiol. Plant.* 99:696-706.

Hahn, D., A. Nickel., y J. Dawson. 1999. Assessing *Frankia* populations in plants and soil using molecular methods. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 29:215-227.

Harriott, O. T., Khairallah, L. & Benson, D. R. 1991. Isolation and structure of the lipid envelopes from the nitrogen-fixing vesicles of *Frankia* sp. strain CpII. *J. Bacteriol.* 173: 2061-2067.

Hartmann, A., J. J. Giraud, y C. Catroux. 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formely *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25:107-116.

Harriot, O. T., L Khairallah., y D. R. Benson. 1991. Isolation and structure of the lipid envelopes from the nitrogen-fixing vesicles of *Frankia* sp. Strain CpII. *J. Bacteriol.* 173:2061-2067.

Hartl, D. L., y D. E. Dykhuizen. 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 18:31-68.

Herridge, D. E., y J. Brockwell. 1988. Contributions of fixed nitrogen and soil nitrate to the economy of irrigated soybean. *Soil. Biol. Biochem.* 20:711-717.

Hönerlage, W., D. Hahn, K. Zepp, J. Zeyer, y P. Normand. 1994. A hypervariable 23S rRNA region provides a discriminating target for specific characterization of uncultured and cultured *Frankia*. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:433-443.

Hughes, J. B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. M. Bohannan. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches for estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4399-4406.

- Huss-Danell, K., y D. D. Myrold. 1994. Intragenetic variation in nodulation of *Alnus*: Consequences for quantifying *Frankia* nodulation units in soil. *Soil. Biol. Biochem.* 26:525-531.
- Jamann, S., Fernandez, M.P, y A. Moiroud. 1992. Genetic diversity of Elaeagneceae-infective *Frankia* strains isolated from various soils. *Acta Ecol.* 13:395-405.
- Jamann, S., M. P. Fernández, y P. Normand. 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., y D. D. Myrold. 1999. Genomic 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. Ritche, y D. D. Myrold. 1999. Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. *Mol. Phyl. Evol.* 13:493-503.
- Jeong, S. C., y D. D. Myrold. 2001. Population size and diversity of *Frankia* in soils of *Ceanothus velutinus* and Douglas-fir stands. *Soil. Biol. Biochem.* 33:931-941.
- Kent, A. D., y E. W. Triplett. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Ann. Rev. Microbiol.* 56:211-236.
- Kim, H.B, y S.A. Chung. 1997. Nucleotide sequence and expression of *nifHD* form *Frankia* strain EuIK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. *Physiol. Plant.* 99; 690-695.
- Kohls, S. J., y D. D. Baker. 1987. Effects of substrate nitrate concentration nodule formation in actinorhizal plants. *Plant. Soil.* 118: 171-179.
- Koschinsky, S., S. Peters, F. Schwieger., y C. C. Tebbe. 1999. Applying molecular techniques to monitor microbial communities in composting

- processes. Microbial Biosystems: New frontiers En: Proceedings of the 8th International symposium of microbial ecology. Bell CR, Brylinsky M. Johnson-Green P (eds). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Kuske, C. R., L. O. Ticknor., M. E. Miller., J.M. Dunbar., J.A. Davis., S. M. Barns, y J. Belnap. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizosphere of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1854-1863.
- Laguerre, G., P. Louvrier., M. R. Allard, y N. Amarger. 2003. Compatibility of Rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae for nodulation of host legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2276-2283.
- Lechevalier, M. P. 1994. Taxonomy of the genus *Frankia* (*Actinomycetales*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44; 1-8.
- Lemanceau, P., T. Corberand, L. Gardan, X. Latour, G. Laguerre, J. M. Boeufgras, and C. Alabouvette. 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1004-1012.
- Liu, W., T. L. Marsh., H. Cheng, y L. J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
- Lovell, C. R., Y. M. Piceno., J. M. Quattro., y C. E. Bagwell. 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rizosphere of the smooth cordgrass, *spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3814-3822.
- Lumini, E., y M. Bosco. 1996. PCR-restriction fragment 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. y M. Bosco. 1999. Polymerase chain reaction Restriction fragment length polymorphisms for assessing and increasing biodiversity of *Frankia* culture collections. *Can. J. Bot.* 77:1261-1269.
- McEwan, N. R., C. T. Wheeler, y J. J. Milner. 1994. Strain discrimination of cultured and symbiotic *Frankia* by RFLP-PCR. *Soil. Biol. Biochem.* 26:547-552.
- Maggia, L., S. Nazaret, y P. Simonet. 1992. Molecular characterization of *Frankia* isolates from *Casuarina equisetifolia* root nodules harvest in West Africa (Senegal and Gambia). *Acta. Ecol.* 13:453-461.swq27.
- Mahaffee, W. F., y J. W. Kloepper. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.* 34:210-223.
- Marc J. E. C. van der Maarel, Rebekka R. E. Artz, René Haanstra, y Larry J. Forney. 1998. Association of marine Archaea with the digestive tracts of two marine fish species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2894-2898.
- Marechal, J., B. Clement, R. Nalin, C. Gandon, S. Orso, J.H. Cvejic, M. Bruneteau, A. Berry, y P. Normand. 2000. A recA gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2:781-785.
- Marschner P., c-H Yang., R. Lieberei., y D. E. Crowley. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil. Biol. Biochem.* 33:1437-45.
- Maynard-Smith, J., N. H. Smith., M. O'Rourke, y B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4384-4388.
- Mirza, M.S., D. Hahn, S. V. Dobritsa, y A. D. L Akkermans. 1994. Phylogenetic studies on uncultured *Frankia* populations in nodules of *Datisca cannabina*. *Can. J. Microbiol.* 40: 313-318.
- Medan, D., y R. D. Tortosa. 1981. Nódulos actinorrícos en especies argentinas de los géneros *Trevoa* (Rhamnaceae) y *Coriaria* (Coriariaceae). *Bol. Soc. Arg. Bot.* 20:71-81.

Moawad, H. A., W. R. Ellis, y E. L. Schmidt. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:607-612.

Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta., G. Muyzer., C. winter., y G. J. Herndl. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3518-3525.

Murry, M. A., A. S. Konopka., S. D. Pratt, y T. L. Vandergon. 1997. The use of PCR-based typing methods to assess the diversity of *Frankia* nodule endophytes of the actinorhizal shrub *Ceanothus*. *Physiol. Plant.* 99:714-721.

Murry, M. A., M. S. Fontaine, y J. G. Torrey. 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr13 grown in batch culture. *Plant. Soil.* 78:61-78.

Myrold, D. D, y K. Huss-Danell. 1994. Population dynamics of *Alnus*-infective *Frankia* in a forest soil with and without host trees. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 533-540.

Nalin, R. A. M. Domenach, y P. Normand. 1995. Molecular structure of the *Frankia* spp. *nifD-K* intergenic spacer and design of *Frankia* genus compatible primers. *Mol. Ecol.* 4:483-491.

Nalin, R., P. Normand, y A. Domenach. 1997. Distribution and N₂-fixing activity of *Frankia* strains in relation to soil depth. *Physiol. Plant.* 99:732-738.

Nalin, R., P. Normand., P. Simonet, y A. M. Domenach. 1999. Polymerase chain reaction and hybridization on DNA extracted from soil as a tool for *Frankia* spp. Population distribution studies in soil. *Can. J. Bot.* 77:1239-1247.

Navarro E., Simonet, P., P. Normand, y R. Bardin. 1989. Genetic diversity among *Frankia* isolated from *Casurina* nodules. *Plant. Soil* 118: 241-247.

- Navarro, E., T. Jaffre, D. Gauthier, F. Gourbiere, G. Rinaudo, P. Simonet, and P. Normand. 1999. Distribution of *Gymnostoma* spp. microsymbiotic *Frankia* strains in New Caledonia is related to soil type and to host-plant species. *Mol. Ecol.* 8:1781-1788.
- Nazaret, S., P. Simonet, P. Normand, and R. Bardin. 1989. Genetic diversity among *Frankia* isolated from *Casuarina* nodules. *Plant. Soil* 118:241-247.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106:283-292.
- Nesmed, X., C. Picard, y P. Simonet. 1995. Specific DNA sequences for detection of soil bacteria pp 414-436. En J.T. Trevors, J. D. Van Elsas (Eds), *IkiunkfbvfdsssNucleic acids in the environment: Methods and Applications*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Nickel, O., O. Pelz., D. Hahn., M. Saurer., R. Siegwolf, y J. Zeyer. 2001. Effect of inoculation and leaf litter amendment on establishment of nodule-forming *Frankia* populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 7: 2603-2609.
- Normand, P., P. Simonet, y R. Bardin. 1988. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.* 213:238-246.
- Normand, P. y J. Bousquet. 1989. Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganism. *J. Mol. Evol.* 29:436-444.
- Normand, P., S. Orso, B. Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J. Dowson, L. Evtushenko, y A. K. Mirza. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of family Frankiaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1-9.
- Normand, P., y C. Chapelon. 1997. Direct Characterization of *Frankia* and of clade phyletic neighbors from an *Alnus viridis* rhizosphere. *Physiol. Plant.* 72: 349-358.
- Normander, B., y J. L. Prosser. 2000. Bacterial origin and community composition in the Barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4372-4377.

- O'Rourke, M., y E. Stevens. 1993. Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non clonal pathogen. *J. Gen. Microbiol.* 139:2603-2611.
- Ochman, H., y R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 157:690-693.
- Palys, T., L. K. Nakamura., y F. M. Cohan. 1997. Discovery and ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1145-1156.
- Paschke, M. W., y Dawson, J.O. 1992. *Frankia* abundance in soils beneath *Betula nigra* and others non-actinorhizal woody plants. *Plant. Soil*13: 407-415.
- Pearson, W. R., y D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 3173-3177.
- Peoples, M. B., y E. T. Crasswell. 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant. Soil.* 141:13-39.
- Pérez, N.O., H. Olivera., L. Vásquez, y M.Valdés. 1999. Genetic characterization of Mexican *Frankia* strains nodulating *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Bot.* 77:1214-1219.
- Peters, S., S. Koschinsky., F. Schwieger., y C. C. Tebbe. 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 930-936.
- Picard, C., C. Ponsonnet., E. Paget., X. Nesme., y P.Simonet. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58. 2717-2722.
- Poly, F., L. Ranjard., S. Nazaret., F. Gourbiere, y L.J. Monrozier. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2255-2262.

- Ranjard, L.F., Poly, J.-C., Lata, C., Mougel, J., Thioulouse, J., y S. Nazaret. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4479 - 4487.
- Raven, J.A., y D. Edwards. 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Exp. Bot.* 52:381-401.
- Redell, P., y G. D. Bowen. 1985. Do single nodules of *Casuarina* contain more than one *Frankia* strains?. *Plant. Soil* 88:275-279.
- Righetti, T.L., C.H. Chard, y R.A. Backhaus. 1986. Soil and environmental factors related to nodulation in *Cowania* and *Purshia*. *Plant. Soil.* 91: 147-160.
- Riffkin, P.A., P. E. Quigley., G. A. Kearney., F. J. Cameron., R. R. Gault., M. B. Peoples., y J. E. Thies. 1999. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 50:261-272.
- Ritchie, N. J., y D. D. Myrold. 1999. Geographic distribution and genetic diversity of *Ceanothus*-infective *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1378-1383.
- Rius, N., M. Fusté., C. Guasp., J. Lalucat, y J. G. Loren. 2001. Clonal structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.* 183:736-744.
- Rönkkö, R.; Smolander, A.; Nurmiäho-Lassila, E. L, y Haahtela, K. 1993. *Frankia* in the rhizosphere of non-host plants: a comparison with root-associated N₂-fixing *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomona*. *Plant. Soil.* 153: 85-95.
- Rouvier, C., Nazaret, S., Fernandez, M., Picerd, B., Simonet, P y Normand, P. 1991. *rnr* or *nif* intergenic spacers and isoenzyme pattern as tools to characterize *Casuarina*-infective *Frankia* strains. En: Eighth International Conference on *Frankia* and Actinorhizal plants, September 2-4, Lyon.

- Rouvier, C., Y. Prin., P. Redell., P. Normand, y P. Simonet. 1996. Genetic diversity among *Frankia* strains nodulating members of the family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:979-985.
- Ruvkun, G.B., y F.M. Ausubel. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77: 191-195.
- Sanginga, N., S.K.A. Danso, y G.D. Bowen. 1989. Nodulation and growth response of *Alloscasuarina* and *Casuarina* species to phosphorus fertilization. *Plant. Soil.* 118: 125-132.
- Scala, D., y L. J. Kerkhof. 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1980-1986.
- Shaffer, B. T., F. Widmer., L.A. Porteous, y R. J. Seidler. 2000. Temporal and spatial distribution of *nifH* gene of N₂-fixing bacteria in forest and clearcuts in western Oregon. *Microbial. Ecol.* 39:12-21.
- Schlöter, M., M. Leubhn., T. Heulin, y A. Hartmann. 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS. Microbiol. Rev.* 24: 647-660.
- Schönfeld, J, H. Heuer, J. D. Van Elsas, y K. Smalla. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7248 - 7256.
- Schwieger, F., y C. C. Tebbe. 1998. A New approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876.
- Schwieger, f., y C. C Tebbe. 2000. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* l33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non target plant (*Chenopodium album*)-linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3556-3565.

Selander, R. K., K. P. Beltran, y N. H. Smith. 1990. evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovares that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* 58:2262-2275.

Silva, C., P. Vinuesa., L. E. Eguiarte., E. Martinez-Romero., y V. Souza. 2001 *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:884-893.

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

Simonet, P., N. Thi Le., A. Moiroud, y R.R Bardin, 1989. Diversity of *Frankia* strains isolated from a single alder stand. *Plant. Soil.* 118: 13-22.

Simonet, P.; Normand, P.; Moiroud, A. & Bardin, R. 1990. Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 153: 235-240.

Simonet, P., M-C. Grosjean, A.K. Misra., S. Nazaret., B. Cournoyer, y P. Normand. 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3278-3286.

Simonet, P., M. Bosco., C. Chapelon., A. Moiroud, y P. Normand. 1994. Molecular characterization of *Frankia* microsymbionts from spore-positive and spore-negative nodules in a natural alder stand. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1335-1341.

Simonet, P., E. Navarro., C. Rouvier., P. Reddell., J. Zimpfer., Y. Dommergues., R. Bardin., P. Combarro., J. Hamelin., A. M. Domenach., F. Gourbière., Y. Prin., J. Dawson, y P. Normand. 1999. Co-evolution between *Frankia* populations and host plants in the family Casuarinaceae and consequent patterns of global dispersal. *Environ. Microbiol.* 1:525-533.

- Smalla, K., G. Wieland., A. Buchner., A. Zock., J. Parzy., S. Kaiser., N. Roskot., H. Heuer, y G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4742-4751.
- Smith, W. H. 1976. Character and significance of forest tree root exudates. *Ecology.* 57:324-331.
- Smolander, A. y Sundman, B. 1987. *Frankia* in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. *Physiol. Plant.* 70: 297-303.
106: 5-72.
- Smolander, A., Van C Dijk, y V. Sundman. 1988. Survival of *Frankia* introduced into soil. 106: 5-72.
- Smolander, A. 1990. *Frankia* populations in soils under tree species with special emphasis on soils under *Betula pendula*. *Plant. Soil.* 121:1-10.
- Smolader, A, y M. L. Sarsa. 1990. *Frankia* strains of soil under *Betula pendula*: Behaviour in soil and in pure culture. *Plant. Soil.* 122. 129-136.
- Souza, V., T. T. Nguyen., R. R. Hudson., D. Piñero, y R. E Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8389-8393.
- Steppe, T. F., J. B. Olson., H. W. Paerl, R. W. Litaker, y J. Belmap. 1996. Consortial N₂ fixation: a strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats. *FEMS. Microb. Ecol.* 21:149-156.
- Sunnucks, P., A. C. C. Wilson., L. B. Beheregaray., K. Zenger., J. French., and A. C. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9: 1699-1710.
- Tan, Z., T. Hurek., P. Vinuesa., P. Muller., J. K. Ladha., y B. Reinhold-hurek. 2001. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing

rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3655-3664.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 22:4673-4680.

Tibayrec, M. 1996. Towards a unified evolutionary genetics of microorganism. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:401-429.

Tortosa, R.D. 1992. El complejo Retanilla-Trevoa (Rhamnaceae). *Darwiniana.* 31:223-252.

Torrey, J.G, y J.D. Tjepkema. 1979. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete- nodulated plants: preface. *Bot. Gaz.* 140 (Suppl.): Si-Sv.

Van de Peer, Y., y R. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10: 569-570.

Van Dijk, C., A. Sluimer., y A. Weber. 1988. Host range differentiation of spore-positive and spore-negative strain types of *Frankia* in stands of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in Finland. *Physiol. Plant.* 72:349-358.

Van Dijk, C., y A. Sluimer-Stolk. 1990. An ineffective strain type of *Frankia* in the soil of natural stands of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. *Plant. Soil.* 127:107-121.

Van Veen, J. A., L. S. van Overbeek, y J. D. van Elsas. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:121-135.

Velásquez, E. P., F. Mateos., N. Velasco., F. Santos., P. A. Burgos., P. Villadas., N. Toro, y E. Martínez-Molina. 1999. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. *Soil. Biol. Biochem.* 31:1039-1047.

- Vogel, J., P. Normand., J. Thioulouse., X. Nesme, y G. L. Grundmann. 2003. Relationship between spatial and genetic distance in *Agrobacterium* spp. in 1 cubic centimeter of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1482-1487.
- Weisburg, W.G., S. M. Barns., D. A. Pelletier, y D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Whittam, T. S., H. Ochman, y K. Selander. 1983. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:1751-175.
- Wieland, G., R. Neumann, y H. Bachaus. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5849-5854.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Yang, C-H., y D. E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron status. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:345-351.
- Young, P. 1992. Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganism. *J. Mol. Evol.* 29:436-444.
- Young, I. M., y K. Ritz. 1998. Can there be a contemporary ecological dimension to soil biology without a habitat?. *Soil. Biol. Biochem.* 30:1229-1232.
- Zepp, K., D. Hahn, y J. Zeyer. 1997. *In-situ* analysis of introduced and indigenous *Frankia* populations in soil and root nodules obtained on *Alnus glutinosa*. *Soil Biol. Biochem.* 29:1595-1600.
- Zuckerlandl, E., y L. Pauling. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8:357-366.

ANEXO 1

Resultados Métodos Bioinformáticos

1.1 Secuencias del fragmento de 360 pb del gen *nifH* de diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno para el análisis por T-RFLP

Bacterias verde-sulfurosas

Pelodictyon luteolum

1 tcgaccogtc tctgctcgg cggactccag cagaaaaccg tgcttgacac gctccgag
61 gagggagagg aagtcgaact cgaagacatc atcaaagagg gataccgcaa
caccogctgc
121 accgagtcog gcggacctga gcccgcgctg ggctgcgag gccgcggcat
catcacctca
181 gtcaacctgc ttgagcagct gggcgcatac gacgaagaat gggacctcga
ctatgtgttc
241 tacgacgtgc tcggcgacgt ggtctgtggc ggattcgcaa tgccgatccg
cgacggaaaa
301 gctgaagaaa tctacatcgt ctgctcc

Chlorobium limicola

1 tctaccogcc tctgctcgg cggctccag cagaaaaccg tactcgatac cctgcgtgag
61 gagggagaag aagtcgaact tgaagatatac atcaaagagg gatacagaaa
caccogctgt
121 accgagtcog gcggaccgga accaggcgtg ggctgtgcag gacgcggcat
cataacctcg
181 gtaaacctgc tcgaacagct tggagcctac gatgaggaat gggatctcga
ttatgtgttc
241 tacgatgtgc tcggtgatgt cgtatgcggc ggattcgcca tgccatccg
cgacggcaaa
301 gcagaagaga tctatcgt ctgctcc

Chlorobium tepidum

1 tcaccogcc tctgctcgg cggctccag cagaaaaccg ttctcgacac
cctgcgag
61 gagggagaag aggtcgaact cgaagacatc attaaagaag gttacagaaa
caccogctgc
121 accgagtcog gtcgtcctga gccctggcgtc ggctgcgctg gccgcggcat
catcacctcg
181 gtcaacctgc tcgaacagct cggcgcttac gatgacgaat gggaaactcga
ctacgtgttc
241 tacgatgtgc ttggcgacgt ggtgtgcggc ggtttcgcca tgccgatccg
cgacggtaaa
301 gccgaagaga tctatcgt ctgctct

Firmibacteria

Clostridium beijerinckii

1 gagggagaaa ctaatatgag acaagtagct atttatggaa aggggtggaat
aggaaaatct
61 actaccacac aaaatttaac ttcagcttta gctgaaatgg ggaaaaatat
aatgatagta
121 ggatgtgatc ctaaagcaga ttctacaaga ttagttcttg gaggtttagc
acaaaaaaca
181 gttctagata cttaagaga agaaggagac gacattgaaat tagatgcaat
cttaaaaaaca

601 tctgcggtgg cttcgcgatg ccgatccgcc agggcaagge gcaggagatc
 tacatcgtca
 661 cctccggcga gatgatggcg atgtacgcgg cgaacaacat cgcccgcgga
 gtcctcaagt
 721 acgcgcactc cggtggtgtc cggctcggcg ggctcatctg caacagccgt
 aacaccgacc
 781 gcgaggacga gctgatcatg gagctcggcc gccgcctcaa caccagatg
 atccacttca
 841 tcccgcgcaa caacgtcgtg cagcacgccg agctgcgccc gatgacggtc
 atcgagtacg
 901 accccaagaa ctcgcaggcc gaccagtacc gcgagctggc ccggaagatc
 gtcgacaacg
 961 acatgaagac gatccccgacg ccgatcacca tggacgagct cgaggagctt
 ctcatcgagt
 1021 tcgggatcat gcagcaggag gacgagagca tcatcgccaa ggcccgcgcc
 gtcgcctgac
 1081 cccagcccag acaccgacgc gcaccogacg ctccctgctc cgacaccgtc
 gaggatgagg
 1141 tcccgatcat gacgac

Cyanobacteria

Nostoc sp

1 atgactgacg aaaacattag acagatagct ttctacggta aaggcgggtat cggtaaactc
 61 accacctccc aaaacacctt tgcagctatg gcagaaatgg gtcaacgcac
 catgattgta
 121 ggt **tgcgacc ctaaagctga ctc**accctt ctgatgcttc actccaaagc
 tcaaaccacc
 181 gtactacact tagctgctga acgcgggtgca gtagaagact tagaactcca
 cgaagtaatg
 241 ttgaccggtt tccgtggcgt taagtgcgta gaatctggtg gtccagaacc
 cgggtgtagt
 301 tgcgccggtc gtggtatcat caccgccatt aacttcttag aagaaaacgg
 cgcttaccaa
 361 gacctagact tcgtatccta cgacgtattg ggtgacgctg tatgtggtgg
 tttcgctatg
 421 cctatccgtg aaggtaaagc acaagaaatc tacatcgta **cctctggtga**
aatgatggcg
 481 **atgtatgctg** ctaacaacat cgctcgcggc attttgaaat atgctcactc
 cggtggtgta
 541 cgttttaggtg gtttgatctg taacagccgt aagggtgacc gtgaagacga
 gttaatcatg
 601 aacttggctg aacgtttgaa cacccaaatg attcacttgc tacctcgtga
 caacatcgtt
 661 caacacgcag aattgcgccc tatgaccggt aacgagtacg caccagacag
 caaccaaggt
 721 caagagtacc gcgcattagc taagaagatc atcaacaacg acaagctcac
 cattcctaca
 781 ccaatggaaa tggatgaact agaagctctg ttgatcgaat acggtctatt
 agacgacgac

841 ttagaacaaa tattaatgga acatggtctt attgattaag atagtattaa
atgtaaaact

Clostridium cellobioparum

1 atgagacagg tagctattta cggaaaaggg ggcacggca aatccacaac
cactcagaac

61 ctcacggcag ggttgggaga gatgggcaag aaaattatga ttgtaggttg
tgatccaaag

121 gccgacteta cccgtctggt gttgggcggt ctggcgcaaa agacggtttt
ggacaccctc

181 cgcgaggaag gcgaagacat tgagctggat acggttctga aggtaggata
cgccggaatc

241 aagggtgtgg aatcgggagg accggagccg gcgtcggctg cgggacgcgg
cattatcacc

301 tcaattggcc tgctggagcg tttaggtgca tatgaggctg atttgatta
tgtattctac

361 gacgttcttg gggatgttgt gtgcggcggg ttcgcgatgc ccattcgtga
aggcaaggcc

421 caggagattt atatcgtgtg ttccgccgag atgatgggcc tgtatgcggc
aaacaatatc

481 gcaaagggga tttcaaaata tgccaacacc ggcgccgtgc gtctgggagg
actgatctgc

541 aactcccgtg aggtagacgg cgaagcggat ttggtcagcc gggtagcgaa
ggagatcgga

601 acccagatga ttcactttgt ccccgcgaca atgcggtgca gaaggcgaa
atcaataaaa

661 agacagttat cgacttttcg cccgatgacc caggccgacg aataccggac
attggcgcgc

721 aagattgacg gcaatgacat gtttgtggtt cccagaccta tgtccatcga
caggctggaa

781 gcaattttga tggaacacgg aatttttagat taa

Desulfotomaculum nigrificans

1 gttgtcggg t **gtgatccaa ggcctgactoc** actcggctgc ttttacacgg
tttaaaccaa

61 aagacgggat tggataccct aagggacgag ggggaagaca ttgaactgga
ggacatcatg

121 cggcagggct atggcggcac cctatgtgtg gaatctggcg gcccggaacc
aggcgtcggc

181 tgcgcgggct ggggcatcat cacttccatt aacctgctgg agtccctggg
ggcttatact

241 cccgacctgg attacgtctt ttacgatgtc ctgggggacg tagtgtcgg
cggttttgcc

301 atgcccaccc ggggaaggcaa ggcccaggaa atctatattg tggcctccgg
tgaaatgatg

361 **gccttatacg** ccgccaacaa catttccaag ggcattcaaa aatacgccca
ttccggcggg

421 gttcgcctgg gcggcattat ctacaacggg cgcaagaccg acaat

Thallobacteria

241 gatatgaga atataagatg cgttgatca ggcggaccan aaccagagt
 301 gtagagta ttatacttc aatagaatg cttgaacaat tagagcata
 taaccctgat
 361 tagactag tatttatga ttttatga gacttgat gctggtt
 tgcattgcca
 421 atcagagag gtaagcaca agaatatat atcgttgat **ctggagaat**
 481 tagcagcta acaatatc aagaatc caaatatg ctaaatg
 tggagtga
 541 taggtgaa catttgaa cagtgaaga gttgtagag atacgaat
 atagaaga
 601 ttgctaag agcttgag tcaactat cacttgta ctagagata
 tatgttca
 661 agagcaga tacacaaca aacgttata gaattgta caagctga
 tcaagctgat
 721 gatagaga catagcta aatataga aataaasa tttttrtat
 tccaaaaca
 781 atgaacaag aagataga agaatacta atgatatg gttatg
 atactaga
 841 tcaatgaca attatcaat caaatcac aatatga
 Clostridium pasteurianum1F16 gene.
 1 gtagaata atcatcct gttagacatc aagggagct nattraaga
 ggaatata
 61 atgagcagt tggctatta cggaaagt ggaatagaa natcaactac
 aacaacaac
 121 ctacagcag gtttagtga aagaggaat aataatag tagttggtg
 tgcctcaag
 181 gcagatcaa caagattat **gtaggaga cttgctcaaa agcagttct**
 tgatacctg
 241 agaagagag gagaagcgt tgaatagat tcatatga aactgata
 tgcctgcaatc
 301 agatgctcg aatccggtg ccaagaaca ggagttaggt gtagcaggaag
 aggaatac
 361 actcaataa atatgcttga acaacttga gcttatag acgatltga
 ttttctc
 421 tagatgta cttgagcgt tgttltgt ggatltgca tgcacatcag
 agaggaaa
 481 gctcagaa tatatatag agcaagtga gaaatgag cactatagc
 tgataaac
 541 atacaaga gtatcaaaa atatgcta agcgttga ttagactg
 tgttatc
 601 tgtaacgta gaaagtltc aaatgatat gaattactg atgcttctg
 aaaaatta
 661 ggaatcaat taatacatt agtcaaca agtccatcag taacaagc
 tgaataat
 721 aagaaaacag ttatagata tgtatcctact tgtgaaacag ctaatgagta
 caggaacta
 781 gctagaaag tagagcaaaa caagattat tagagcaaaa agcaatgac
 tcaagaaga
 841 gctagaaag tagagcaaaa caagattat tagagcaaaa agcaatgac
 tcaagaaga

Frankiaalni

1 aggaggagca cgcgatgcgc cagatcgect tctacggcaa ggggtggtatt ggcaagtcca
61 ccaccagca gaacaccatg gcggccatgg ccgagatggg ccagcgggtc
atgatcgtcg

121 gg **tgtgaccc gaacgctgac** tegacccgcc tgatcctgca ctogaaggcg
cagacctccg

181 tcatccagct cgcggccgag aagggttcgg tcgaggacct ggagctcgac
gaggtgctcg

241 tcgagggcca gtggggcatc aagtgcgtcg agtccgggtg cccggagccg
ggcgtcggct

301 gcgccggccg tggcgtcatc acctccatca cctacctgga ggaggccggc
gcgtacgaga

361 acctcgactt cgtgacctac gacgtectcg gtgacgttgt gtgtggtggc
ttcgcgatgc

421 cgatccgcca gggcaaggcg caggagatct acatcgtcac **ctccggcgag**
atgatggcga

481 **tgtacgcggc** gaacaacatc gcccaggca tcctgaagta cgcgcactcc
ggcggcgtcc

541 ggctcggcgg gctcatctgc aacagccgca agaccgaccg cgaggacgag
ctgatcatgg

601 agctcgcccg ccgcctcaac acccagatga tccacttcat cccgcgtaac
aacgtcgtgc

661 agcacgccga gctgcgccgg atgacggtca tcgagtacga cccgaagaac
agccaggccg

721 acgagtaccg ccagctcgcc aacaagatcg tcaacaacga catgaagacg
atcccctaccc

781 cgatcacaat ggacgagctc gaggagctcc tcatcgactt cgggatcatg
gcgcaggagg

841 acgagagcgt gatcggcaag gccgccggcg tcgcctgacg atcccacgcc
ctcctgcacc

901 gacaccgctg aggatgaggt cccgaccatg acgacgactc cggcacc

Frankia sp

1 ccgaccgcat ccgcgccgac gggttcagca cgaccagcaa ggccccgcac atccagcagg
61 gttcagcacg acccagcaac ggtagtgccg aggtcccggc ccaaccgcac
cggcgacgcc

121 cggcatcccg cagacccgaa ccgtgtgacc gggcgaccg cctggtcagc
cccgttgatc

181 cgcgagccgc agaccgtacc aaggaggacg accacatgcg ccagatcgcc
ttctacggca

241 aggggtggtat cggcaagtcc accaccagc agaacacat ggccggccatg
gccgagatgg

301 gcaagaaggt catgatcgtc ggctgtgacc cgaaggccga ctcgaccgc
ctgatcctgc

361 actogaaggc gcagacctcc gtcatccagc tggcggccga gaaggggtcg
gtcgaggacc

421 tggagctcga cgaggtcctg gtcgagggcc agtggggcat caagtgcgtg
gagtccgggtg

481 gcccgagcc ggccggtggc tgcgccggcc gtggcgtcat cacctccatc
aactacctgg

541 aggaggccgg ccctacgag gacctcgaact tcgtgaccta cgacgtcctt
ggcgacgtcg

841 accaagcact ctgaaatcat cggtaagccc gcagaagcta ccaaatag

Nodularia sp.

1 tccaccggtt tgatgetaca cagtaaagct caaacaaccg ttcttcaactt ggctgngaa
61 cgtgggtgcag tagaagatat cgaaatcgaa gaagtaatgc tgaccggttt
ccgtaacggtt
121 cgttgcgtag aatctgggtg tccagaaccc ggtgtaggtt gtgctggctg
tggtattatc
181 accgccatca acttcttaga agaaaatggt gcttaccaag acttagattt
cgtatcttac
241 gacgtattag gtgacgttgt atgtgggtgt tttgctatgc ctatccgtga
aggtaaggca
301 caagaaatct acatcgtgac a

Synechocystis sp

1 tctaccggtt taatcctcaa ctgtaaagct caggtaactg tattacactt agctgctgaa
61 atgggttctg ttgaagactt agaactcgaa gacgtaatgc tcgaagggtt
tgaaggcatc
121 aagtgtgtag aatctgggtg tctgagcct ggagttggtt gtgctggctg
tggtattatc
181 acctccatca acttcttaga agaagaagga gcttacgaag acttagaatt
cgtatcctac
241 gacgtattag gggacgttgt atgtgggtgt ttcgctatgc ctatccgtga
aggaaaagca
301 caagaaatct acatcgttac ctct

Anabaena variabilis

1 atgactgacg aaaacattag acagatagct ttctacggta aaggcggat cggtaaactt
61 accacctccc aaaacacct tgcagctatg gcagaaatgg gtcaacgcac
catgatcgta
121 ggttgcgacc ctaaagctga ctccacctgt ttgatgctcc acgctaaagc
gcaaaccact
181 gtacttcaact tggtgctga acgcggtgca gtagaagact tagaactaca
cgaagtaatg
241 ttgaccggtt tccgtggcgt tcgttgcgta gaatctggtg gtccagaacc
cgggtgtagt
301 tgcgccggtc gtggtatcat caccgccatt aacttcttag aagaaaacgg
tgcttacaa
361 gacctagact tcgtatccta cgacgtattg ggtgacggtt tatgtggtg
tttcgctatg
421 cctatccgtg aaggtaaagc acaagaaatc tacatcgta cctctggtga
aatgatggcg
481 atgtatgctg ctaacaacat cgctcgcggt attttgaat atgctcactc
cgggtggtgta
541 cgett ggggt gtttgatttg taacagccgt aaaactgacc gggagccga
attgatcgaa
601 aacttggctg aacgtttgaa cactcaaatg attcacttcg tacctcgtga
caacatcggt
661 caacacgctg aattgcgtcg gatgactggt aacgagtacg caccagacag
caaccaaggt
721 caagagtacc gtgcattagc caagaaatc atcaacaacg acaagctcac
cattcctaca

781 ccaattgaaa tggatgaact cgaagccctg ttgatcgaat acggtattct
tgatgatgat
841 tctaagcacg cagaaatcat cggtagccc gcagaagcta ccaaatag

Gloeotheca sp

1 tctactcgct tgatccttaa ctgtaaagcg catgtcacag ttctacactt agccgcagaa
61 cggggttctg ttgaagatat agaactcgaa gatgtactgc tcacagggtt
tgaagacatc
121 aaatgcgtag aatcagggtgg tctgaacct ggcgtaggat gcgctggctg
tgggattatc
181 actgccatca acttccttga agaagaagga gcttacgaag acatagattt
cgtatcctac
241 gacgtattag gggacgttgt ctgcggtggt ttcgctatgc ctatccgtga
aggaaaagca
301 caagaaatct acatcgtaac ctct

Fischerella sp

1 aggagaaatc atcatgtccg acgaaagaat tagacaaata gctttctatg
gtaaaggcgg
61 tattggtaaa tctaccacct cgaaaatac cctcgtgca atggcagaaa
tgggtaaacg
121 gattttgatt gtaggatgcg atcctaaagc tgactccacc cgcttaatcc
tccactgtaa
181 agctcaaacc accgtgttac acctggcagc agaaaagggt gcagtagaag
acttagaatt
241 ggaagaagta gtaatcaatg gttttcgtaa tattaggtgt gtagaatctg
gtggtcctga
301 acctggtgta ggttgtgctg gtcggggtat catcactgcc attaactttc
ttgaagaaaa
361 cggcgcttac caagacctag attttgtctc ctatgatgta ttgggtgacg
ttgtgtgcgg
421 tggtttcgct atgcctatcc gtgaaggtaa agcccaagaa atctacatcg
ttacctctgg
481 tgagatgatg gcgatgtttg ctgccacaa catctctcgc ggtattctca
agtatgcca
541 ctccggtggt gtgcgcttgg gtggtttaat ttgtaacagc cgtaaaaactg
accgcgaatg
601 ggacttaatc agcgagttgg caagacgaat tagtactcaa atgattcact
ttgtcccccg
661 tgacaacatt gtgcaacatg ctgagttgcg tcggatgact gtaaatgagt
atgcaccaga
721 cagcaatcaa gcaaatgaat accgtacatt agctacgaag atcatcgaca
acgaatttat
781 ggctgttcca acaccctgg aaatggacga gctagaagag ctgctgattg
agtttggat
841 tctcgaaagc gatgaacaag ttaagcaact gactgagaca gataaagcag
ctaaagaaag
901 tgagaaaaaa caagaagatg ctgaaggcga agcctag

Chlorogloopsis sp

1 tctaccgct tgatgtaca cagtaaagct caaactaccg tattgcactt
ggctgctgaa

61 cgtggagcag tcggagacct agaactagaa gaagtaatgc tcaactggctt
 ccgtggtgtg
 121 aagtgcgttg agtctggtgg gccagaacca ggcgtagggt gtgctggtcg
 tggattatc
 181 accgccatca acttcttaga agaaaatggt gcctaccaag atggtgactt
 cgtatcttat
 241 gacgtactag gcgatgttgc gtgtggtggt tttgcaatgc ctatccgcga
 aaataaagca
 301 caagagattt acattgtaac atcc
 Xenococcus sp
 1 tccactcgtt tgatgctgca cactaaagcc caaactacta ttctttctct tgcagcagaa
 61 agaggttctg tcgaagacct tgaactcgaa gaagtattac tcaactggcta
 taacaacggt
 121 cgctgcgttg aatctggtgg tcccgaacct ggtgtagggt gtcctggctg
 cggattatt
 181 acagcaatta acttcctaga agaagaaggt gcttacgaag atctagactt
 agtatcctac
 241 gatgtattgg gtgacgttgt ttgcggtggt .ttgcatgc caattcgtga
 aggtaaagcc
 301 caagaaatct acattgtcac ttct

Proteobacteria: subdivision alpha

Rhizobium sp

attcaagaca tgtcgtcact gagacagatc
 541 gcattttacg gcaagggggg catcggcaag tcgacgacgt cccagaacac
 gctggcggcg
 601 ctggcggaga tgggccatcg catcctcatc gtcggc **tgcg accccaagggc**
cgactcaacc
 661 cgcctcatcc tgcacgcaa ggcgcaggac accatcctgt cgctggcgcg
 cgccgcggcg
 721 agcgtcgaag acctcgagct cgaagaggtc atgaagatcg gctaccgca
 catccgctgc
 781 gtggaatccg gcgggccgga gccgggcgtc ggctgcgcgg ggcgcggcgt
 catcacctcc
 841 atcaatttcc tggaggagaa cggcgcctat gaggacatcg actacgtctc
 ctacgacgtg
 901 ctggcgacg tgggtgtcgg cggcttcgcc atgcccaccc gcgagaacaa
 ggcgcaggaa
 961 atctacatcg tcatgtccgg **cgagatgatg gccatgtatg** cggccaacaa
 catctccaag
 1021 ggcatttca agtacgcaa ttccggcggc gtgcgcctgg gcgggctcgt
 ctgcaacgag
 1081 cgccagacgg acaaggagct ggaactggcc gagaacctcg ccaagaagct
 cggcaccag
 1141 ctcatctatt tcgtgccgcg cgacaacatc gtgcagcacg ccgagctgcg
 ccgcatgacg
 1201 gtgategagt atgcgccga cagcgttcag gcgaacct actcgaaacct
 cgctgagcgc
 1261 gtccacaaca atggcggcaa gggcatcatc ccgaccccca tcaccatgga
 cgagctcgag

241 gccactcgg gggcggtgcg gctcggcggg ctgatttgca atgagcgcca
gacggaccgc
301 gaactcgatc tcgccgaggc actggcggcc aagctcaatt ccaagctcat
ccacttcgtg
361 ccacgagaca acatcgtcca gcatgccgag ctccaggaaga tgacggttat
ccagtatgcg
421 cggagtcca aacaggcggc ggagtatcgc gcgctagctg agaagatcca
tgccaattcg
481 ggtcaaggca ccatcccagc cccgatcacc atggaggaat tggaagacat
gctgctcgac
541 ttcggcatca tgaagacc

Bradyrhizobium sp

1 cagatcgcgt ttacggcaa aggcggcacc ggcaaatoga cgacgtcgca gaacaccctc
61 gcagcgcctcg ccgagatggg tcatcggatc ctgatcgtcg gc **tgcgaccc**
caaggcggat
121 tcgactcgcc tgatcctgca cgccaaggca caggacacca tcctgagcct
ggcgcgtgcc
181 gccggcagcg tcgaggacct cgagatcgaa gaggtcatga aggtcggcta
tcgcgacatc
241 cggtgcgtcg agtccggcgg tccggagccg ggcgtcggct gcgcggcccg
cggcgtcatc
301 acctcgatca acttcctgga agagaacggc gcctatgagg acatcgacta
cgtgtcctac
361 gacgtgctcg gcgacgtggt ctgcggcggc ttcgcgatgc cgatccgcga
gaacaaggcg
421 caggagatct acatcgtgat gtccggcgaa **atgatggcaa t**

Xanthobacter flavus

tcgaccgcgc tgatcctgca cgccaaggcg caggacacca tcctttcgtt ggccgcgaac
61 gcgggttcgg tggaagacct cgagctcgag gacgtgatga aggtcggcta
caacgacatc
121 cgctgcgtgg agtcgggtgg cccggagccg ggcgtcggct gcgcggcccg
tggcgtgatc
181 acctcgatca acttccttga ggagaacggc gcctacgagg acatcgacta
cgtgtcctac
241 gacgtgctgg gcgacgtggt gtgcggcggc ttcgcgatgc cgatccgcga
gaacaaggct
301 caggaaatct acatcgtcat gtcc

Rhodobacter sphaeroides

ccatgggaaa actccggcag atcgctttct acggcaaggg
301 cgggatcggc aagtcgacga cctcgcagaa caccctcgcg gcactggctg
agatgggtca
361 gaagatcctc atcgtcggc t **gcgatcccaa ggcgactcg** accgcctga
tcctgaacac
421 caagctgcag gacaccgtgc ttcacctcgc cgccgaagcg ggtccgctcg
aggatctcga
481 actcgaggat gtggtcaaga tcggctaaa gggcatcaaa tgcaccgaag
ccggcgggccc
541 ggagccgggc gtgggctgcg cgggcccggc cgtcatcacc gccatcaact
tcctggaaga

601 gaacggcgcc tatgacgacg tcgactacgt ctctacgac gtgctgggcg
acgtggtctg
661 cggcggcttc gccatgccga tccgcgagaa caaggcgag gaaatctaca
tcgtcatg**tc**
721 **ggcgagatg atggcgctct atggcgccaa** caacatcgcc aaggcatcc
tgaaatagc
781 gaactcgggc ggcgtgcgcc tcggcggcct gatctgcaac gagcgcaaga
ccgaccgca
841 gctggaactg gccgaggccc tcgccgcgcy tctgggctgc aagatgatcc
acttcgttcc
901 gcgcgacaat atcgtgcagc acgccgagct ccgccgcgag acggteatcc
agtatgcgcc
961 cgagagcaag caggcgcagg aatatcgca actggcccgc aagatccacg
agaactcggg
1021 caagggcgtg atcccgacc cgatcaccat ggaagagctg gaagagatgc
tgatggattt
1081 **cggcatcatg cagtcgagg aagaccggct cggcccatc gccgcgccc aggcctgat**

Rhodopseudomonas sp

1 cagatcgct tttacggcaa gggcggcatc ggcaagtcca ccacctcgca gaactctg
61 gccgctctgg tcgagatggg tcagaagatt ctgatcgtcg gctgcgacc
caaggcggac
121 tccaccggcc tgatcctcaa caccaagatg caggacacgg tgctgagcct
cgccgcggaa
181 gcgggttcgg tcgaggacct cgaactcgaa gacgtgatga aggtcggcta
caaggcatc
241 aagtgcaccg aagccgggtg tcccgagccg ggcgtcggct gcgccggccg
cggcgtcatc
301 accgcgatca acttcctoga agagaacggc gcctatgagg acgtcgaeta
cgtctcctac
361 gacgtgctcg ggcagctggt gtgcggcggc ttcgcgatgc cgatccgca
gaacaaggcc
421 caggaaatct acatcgtgat gtccggtgaa atgatggcac t

Methylosinus sp

1 agagccatca tctcgccgga catgacgatg tagatctct gagccttggt ctacggatc
61 ggcacgcga agccgcgca gaccacgtcg ccgagcacgt cataagaaac
gtagtcgacg
121 ccgtcgtaag cgcctgctc ctcgaggaag ttgatcgagg tgataacgcc
acggccggcg
181 cagccaactc ccggtccgg accaccggac tcgacgcaac ggatgtcttc
gaagccgacc
241 ttcacgacgt ctccgagctc gagatcctcg accgaaccgg ctccggcggc
cagggaaagg
301 atggtgtcct gagccttggc gtgcaggatc agacgggtcg agtccgcctt
aggatcgca

Proteobacteria: subdivision beta

Azoarcus sp

agtttcaaca tggcaaagct gcgtcaatgc gccatttatg gcaagggcgg

661 tatcggcaag tcgaccacca cccagaacct ggttgcgcc ctggccgaag
ccggcaagaa

721 ggtcatgata gtcggg **tgcg accogaaggc tgaactcacc** cgtctgatcc
tccacagcaa

781 ggcccagacc accgtgatgc acctggccgc tgaagccggc tcggttgaag
acctcgaact

841 cgacgacgtc ctgtcgggctg gcttcgggtgg cgtgaagtgc gtcgagtcgg
gcggtccgga

901 acccggcgtc ggctgcgccg gccgtggcgt taccaccgcc atcaacttcc
tggagaaga

961 aggcgcctac gacgacgaac tcgacttcgt gttctacgac gtgctgggcg
acgtggtgtg

1021 tgggtggcttc gcgatgccga ttcgcgaaaa caaggcccag gaaatctaca
tcgtctgctc

1081 gggcgaaatg atggccatgt accgcgccaa caacatcgcc aaggcatcg
tgaagtacgc

1141 caactccggg ggctgcgcc tggcgccct gatctgcaac agccgcaaca
ccgaccgca

1201 agacgaactg atcgaagcgc tggccgccgc catgggcacc cagatgatcc
acttcgtgcc

1261 gcgtgacaac gccgtgcagc accgcgaaat ccgccgatg accgtcatcg
agtacgacc

1321 gaccacaag caggccgacc agtaccgtca gctcgcccag aagggtctga
acaacaagat

1381 gctcgtcatc ccgacccga tcgagatgga acagctcga gccctgctga
tggaaatcgg

1441 catcatggaa caggaagacg agtccatcgt cggccagacc gctgccgagc
ttgccgccg

1501 cgccgctgcc taagtcagcc

Alcaligenes faecalis

601 taattatggc aatgcgtcaa tgcgctattt accggaaggg tggaaatcgga
aatccacca

661 cgaccagaa cctcgtggcg gccctggccg aactcggcaa aaaggttatg
atcgtcggc t

721 gcgaccccaa ggccgactcc actcgctga tctgcactc caaggcgcag
aacaccatca

781 tggaaatggc cgccgaggcc ggtaccgtgg aagacctgga actcagaggac
gtgctcaaga

841 ccggctacgg cgacatcaag tgcgtcgagt cggcggtcc ggagccgggc
gtgggctcgg

901 ccggctcggc cgtgatcacc gcgatcaact tctcgaaga gaaggccgcc
tacgaggatg

961 acctggactt cgtcttctac gacgtgctcg gcgacgtggt ctgtggcggc
ttcgccatgc

1021 ccatccgca gaacaaggcc caggagatct acgtggtctg **ctccggcgag**
atgatggca

1081 tgtatgccgc caacaacatc tccaagggca tegtgaagta cgccaactcc
ggcagcgtgc

1141 ggctcggcgg gctgatctgc aacagccgca acaccgaccg cgaggacgag
ctgatcatgg

1201 ccctggccga caagctgggc tcgcatga tccacttcgt cccgcgcgac
aacgtggtgc
1261 agcgcgccga aatccgccgc atgaccgtca tcgagtacga ccccgccgcc
aagcaggccg
1321 acgaataccg gaccctggcg aagaagatcg tcgagaacaa gaaactggtc
atccccaccc
1381 cgatcagcat ggacgagctg gaagccttgc ttatggagtt cgggatcatg
gacgaggaag
1441 acatgacat cgtcggcaag accgccgccg aggaaccagc ttttgtcc cttagtgaagatggcatt gcgicaggtg
gcaattacg

T.ferrooxidans ni

121 catagtgtta aatagccat gatgaacttg gcacggccct tgcaacagcg
aggacggaac
181 gcgactcgtc cttttgggg ggettccatc tggcaagcta gtcattttta
aataggagac
241 atggcaatga gtgacaaact aagacaaatc gccttttatg gtaaaggggg
cattggcaag
301 tccacgacct cgcagaaaca cctggcggca ctggoggaaa tgggacagaa
aattctcatc
361 gtcggcccaacaacat ctccaagggc gtgetcaagt atgccaactc
cggcggcgta
781 cgtctgggcg gctcatctg taacgagcgt cagaccgaca aggaactgga
actggccgag
841 gcattggccg gcaaactggg caccaagctc attcatttcg taccocgca
cttcatcgtg
901 cagcatgccg aattgcggcg catgacggtg ctggaatag caccggaatc
caagcaggcg
961 caagaatacc ggactctggc ggaaaaaatt catgccaatg ccggcaacc
ggctatcccc
1021 accccgatca ccatggacga gttggaagat ctgcttatgg acttcggcat
catgcagaag
1081 gaagacacca gcatcatcgg caagactgct gccgaattgg cggctgcggg
aatgtaatga
1141 acgtggcgc gggttgtca ccgtccccc caggatggtg cacctaattg aagcaaggag

proteobacteria: subdivisión gamma

Azotobacter chroococcum

1 cagacacgaa gaagccggcg ccgtgacatg cccgccatgg actgetgctc cgtcggccga
61 cgccacttcc tgcaccagcc ggcatgaacc ccggtaccac atgggaacgg
atcggccgcg
121 cgttactacc ggtacgccgc cagcccggga cgacgcagat cgctgccgtc
cgactccccga
181 cacatgccat atgcagcatg aaatatcgct gaaaacatat tactggtttt
tttatccaaa
241 aaacaaacaa catatgaaat tcacatcttg atggcaccac ccttgctcca
tcccctgcga

301 caccagtcaa acgccacgaa tcaatggagg ttccaagatg gcattgcgtc
 agtgtgcaat
 361 ttacggcaag ggtggtatcg gcaagtccac caccaccag aacctggtcg
 ccgcgctcgc
 421 cgaggccggc aagaaggtga tgatcgtcgg t **tgcgaccog aaagccgact**
 ccacccgcct
 481 gatcctgcat tccaaggccc agaacaccgt catggagatg gccgcatccg
 ccggctcggg
 541 tgaagacctc gagctggaag acgtgctgca gatcggctac ggcggcgtca
 agtgcgtcga
 601 gtccggcggc cctgagccgg gcgtcggctg cgcgggccgt ggcgatgca
 ccgcatcaa
 661 cttcctgga gaggaaggcg cctacagcga cgacctggac ttcgtgttct
 acgacgtgct
 721 gggcgacgtg gtgtgcggcg gcttcgccat gccgatccgc gagaacaagg
 ccaggaat
 781 ctacatcgtc **tgctccggcg agatgatggc catgtacgcc** gccaacaaca
 tcgccaaggg
 841 catcgtgaag tacgccact ccggcagcgt gcgtctgggc gggctgatct
 gcaacagccg
 901 caagaccgac cgcgaagacg agctgatcat ggccctggcc gcgaagatcg
 gcacccagat
 961 gatccacttt gtgccgcgcg acaacgtcgt gcagcacgcc gaaatccgcc
 gcatgaccgt
 1021 gatcgaatac gatccgaaag ccaagcaggc cgacgagtac cgtgccctgg
 ccagaagat
 1081 cctcaacaac aagctgctgg tcatcccgaa cccggcgagc atggaggacc
 tcgaagagct
 1141 gctgatggag ttcggcatca tggaagccga agacgagtc atcgtcggca
 aggccggcgc
 1201 cgagggctga tcccgccggc gcagtgtttg cggaggagcg tgcgtcggcg
 gctgtccgga
 1261 atggcttctc gcggccggca cgcgcctc cttttgaaat cgccccgaat
 tctccaacct
 1321 caggagctga ccctatggcc atggccatcg acggctacga atgcaccgtc
 tgcggcgact
 1381 gcaagccggt ctgcccgacc ggctcgatcg tcctccaggc cggtatctac
 gtgatcgacg
 1441 ccgacagctg caacgagtgc gccgacctgg gcgagccacg ctgtctcggc
 gtctgccccg
 1501 tggacttctg catccagccg ctcgatgact gaagactgaa cgagccgcac
 ccgcttgccg
 1561 gcgacagagc atcccgcgc tctgccaccg gaccaccaa cgcgatcgc
 tttcctcagg
 1621 gcgatcgccg tttttctct cctgaccgca cctt

Methylomonas sp

1 atcgccatca tctcgctga gcatacgatg taaatttctt gggctttggt
 ttcacgaatt

61 ggcacgcga aaccaccgca aacaacgtca cccaatacat cgtagaatac
gaagtcgagg
121 tcgtcggtat aagcaccttc ttcttccaag aagttgatcg cggtgataac
accacggccg
181 gcgcaaccta caccggctc tggaccgect gattcaacgc atttaacgtc
gcggtaaccc
241 actttcaata cgtcttcag ttccaaatct tctacgtac cggcatcagc
tgccatttgc
301 atgatagagt tttgcgcttt cgcacgcagg atcaaacgag tagaatcggc
cttcggatca
361 ca

Klebsiella pneumoniae

1 atgaccatgc gtcaatgcgc tatttacggt aaaggcggta tcggtaaatc caccaccacg

61 cagaacctcg tcgccgcgct ggcggagatg ggtaagaaag tgatgatcgt
cggc **tgogat**

121 ccgaaggcgg actccaccog tctgattctg cacgccaaag cacagaacac
cattatggag

181 atggccgcgg aagtcggctc ggtcgaggac ctgcaactcg aagacgtgct
gcaaattggc

241 tacggcgatg tgcgctgcgc ggaatcgggc ggcccggagc caggcgtcgg
ctgcgcggga

301 cgcggcgtga tcacggcgat caactttctt gaagaagaag gcgcctacga
ggacgatctc

361 gatttcgtgt tctatgacgt gctcggcgac gtggtctgcg gcggcttcgc
catgccgate

421 cgcgaaaaca aagcccagga gatctacatc gtctgctccg **gcgaaatgat**
ggcgatgtac

481 gcggccaaca atatctcaa agggatcgtt aaatagcca aatccggcaa
ggtgcgcctc

541 ggcggcctga tctgtaactc acgtcagacc gaccgtgaag acgaactgat
tattgccttg

601 gcggaaaagc tcggtacca gatgatccac tttgtgccc gcgacaacat
cgtgcagcgc

661 gcggagatcc gccgcatgac ggttatcgag tacgacccc cctgtaaaca
ggccaacgaa

721 taccgaccc tggcgcagaa gatcgtcaac aacaccatga aagtggtgcc
gacgcctgc

781 accatggatg agctggaatg gctgctgatg gagttcggca tcatggaaga
ggaagacacc

841 agcatcattg gcaaaaccgc cgcggaagaa aacgggcct gagcacagga
caattat

K oxytoca

1 tccacccgcc tgatcctgca cgctaaagca cagaacacca ttatggagat ggccgaggaa

61 gtcggctcgg tcgaggatct cgagctcgaa gacgtgctgc aaattggcta
cggcgacgtg

121 cgtcgcgg aatccggcgg ccggagcca ggctcggct gcgcggggcg
cggcgtgatc

181 acggcgatca actttcttga agaagaagc gcctacgagg acgatctcga
ttttgtcttc

61 aaagtgatga tcgtcggctg cgaccctaaa gctgactcca ctcgtctgat
cctgcactcc
121 aaagcccaga acaccatcat ggaaatggct gctgaagccg gtaccgttga
agatctggag
181 ctggaagacg ttctgaaagt cggcttcggt ggcgttaagt gcggtgaatc
cggtggtcca
241 gagccaggcg ttggttgccg tggccgtggt gttatcaccg ccatcaactt
cttagaagaa
301 gaaggcgcgt acgaagacga tctggacttc gtattctacg acgtactggg
tgacgtagtt
361 tgcggtggct tcgctatgcc aatccgtgaa aacaagctc aggaaatcta
catcgtc

1 ggtattggta agtcgacgac tactcaaaac ctcgtggccg ctctggccga
agcgggcaag

61 aaagtgatga tcgtcggctg cgaccctaaa gctgactcca ctcgtctgat
cctgcactcc
121 aaagcccaga acaccatcat ggaaatggct gctgaagccg gtaccgttga
agatctggag
181 ctggaagacg ttctgaaagt cggcttcggt ggcgttaagt gcggtgaatc
cggtggtcca
241 gagccaggcg ttggttgccg tggccgtggt gttatcaccg ccatcaactt
cttagaagaa
301 gaaggcgcgt acgaagacga tctggacttc gtattctacg acgtactggg
tgacgtagtt

Pseudomonas stutzeri

1 atcggcaaat ccaccacgac ccagaacctc gtggcggccc tggccgaact
cggcaagaag
61 gtcattgatcg tcggetgcga ccccaaggcc gactccactc gcctgatcct
gcaactccaag
121 ggcgagaaca ccatcatgga aatggcggcg gaggcggta ccgtggaaga
cctggaactc
181 gaggacgtgc tcaagaccgg ctacggcgac atcaagtgcg tcgagtcggg
cggtcgggag
241 ccgggcggtg gctgcgcggg tcgcccgtg atcaccgcga tcaacttct
cgaagaggaa
301 ggcgcctacg aggatgaact ggacttcgtc ttctacgacg tgctcggcga
cgtcgtc

Vibrio diazotrophicus

1 tcaactcgtc tcatcctgca ctcaaaagca caaaacacca tcatgggaat ggcagcggaa
61 gccggtacgg ctgaagacat cgaactagaa gatgtattga aagtcggtta
tggcgatggt
121 cgctgtgtgg aatcaggcgg ccctgagcca ggcgtaggtt gtgctggtcg
cggtggttatc
181 acagcaatca acttctcga agaagaaggc gcgtatgaag atgacttaga
tttcgttttc
241 tacgacgtat tgggtgacgt tgtgtgtggt ggtttcgcga tgccaattcg
tgaaaacaaa
301 gcggaagaaa tctacatcgt atgttct

Proteobacteria: subdivisión delta

Desulfovibrio salexigens

1 tccacccgtc tgctgctcgg tggctcggct cagaaatccg ttctcgacac
ccttcgtgaa
61 gaaggtgaag acgttgaact tgaggatata cgtaaaccg gtttcggcga
atcatggtgt
121 gttgagtcgg gcggtcctga acccggcgtg ggctgtgcag gtcgcggtat
catcacttcc
181 atcaacatgc tcgaaaacct cgggtgcctac gaagaaggcg aaaacctcga
ctatgttttc
241 tatgacgttc tcggtgacgt tgtttgcggt ggattcgcca tgcccatccg
cgatggtaag
301 gctgaagaaa ttacatcgt atgttcc

Desulfovibrio africanus

1 tccacccggc tectgctgca cggcctggcc cagaagaccg tgctcgacac
cctgcgcgag
61 gagggtgagg acgtggagct tgaggacata atcaagctcg gctacggcgg
cgtcatgtgc
121 accgagtcog gcggaccoga gccgggcgtg ggttgocgog gccgcggaat
catcacttcc
181 atcaacttgc tggaacagct cggcgcctac aatgaagaca agaacctaga
ctacacctc
241 tacgacgtgc tcggcgacgt tgtctgcggc ggcttcgcca tgcccatccg
cgagggcaag
301 gcccaggaga tctatcgt ggtctcg

Desulfobacter latus

1 tccgcacggc tcatgctcaa cggactggcc cagaaaaccg ttctggagac cctgaggaa
61 gagggtgagg atgtggaact ggaagacgtg agaaaagaag ggtacggcgg
ggtcctgtgt
121 acggaatccg gcgggccgga acccgggtgc ggctgcgcgg gccgggggat
catcacctcc
181 atcaatctgc tggaacagct gggcgcctat gacgaagagc agcatctgga
ttatgtattt
241 tatgatgttc tgggcgacgt ggtctgcggc gggtttgcca tgcccatccg
tgagggcaaa
301 gcccaggaga tctatattgt tgtatcc

Archeobacteria

Methanococcus vannielii

1 agtacaaggt taatcttgca cggaaaacaa caaacaacaa tgatggacac attaaggaa
61 aaaggggaag acgaatgtac tctgataaa gttattgaaa ccggattttg
tgagtcagg
121 tgtgtagaat caggtgggcc ggaaccaggt gtggggtgtg caggtagagg
cgttataacc

181 gcaattacac tcatggaaca acacggtggt tacgaagaca accttgactt
cgtattcttc

241 gatgttttag gggacgttgt atgcggtgga tttgcaatgc ctgtaaggga
cggtaaagca

301 gacgaaatct acgttgtagc atcg

Methanothermobacter thermautotrophicus

1 agcacacgcc tgatactggg cggtaaaatg cagacaacaa tgatggacac cctgcgtgaa

61 cttggagagg gcgcatgcac accagataag gttatagaaa caggatttgg
aggtgtaaag

121 tgtgttgagt caggaggccc agaaccaggt gtcggatgcg caggcagggg
tggtataacc

181 gccataacc tcatggagag acacggggtc tacgaaaatg atctggactt
tgtattcttt

241 gacgttctag gggacgtggt atgcgggcgc ttcgcaatgc cagtggagaga
cggaaaggca

301 gaggaaatat acattgtggc atca

Burkholderia tropicalis

1 ttgcgattta tgggaagggg ggcacggca agtcgaccac ctcgcagaac
acgctcggg

61 cgctcaccga cctcgggcag aagatcctga tcgtcggctg cgaccgaag
gccgattcga

121 cgcggtgat cctgcaecg aaggcgcagg acacgatctt gtcgctcgca
gcggaagcgg

181 gatcggtcga ggacctgaa ctcgaggacg tgatgaagat cggttacaag
gacatccgct

241 gcgtcgagtc gggcgccccg gaaccggcg tcggctgcg cggtcgaggc
gtgatcacgt

301 cgatcaactt cctcaggaa aacggtgcct atgacggtgt cgactacgtg
tcgtacgacg

361 tgctcggcga cgtcgtctgc ggcggc

Burkholderia sp

tccatgagca aagcgctct gcgtcagatc gccttttacg gcaagggcgg

1201 tatcggaag tccaccacct cgcagaacac cttggccgcc ctggtcgate
tcggtcagaa

1261 gatcctgatc gtcggc **tgcg accogaagge ggactcgacc** cgectgatec
tgcacgcaaa

1321 ggcccaggac accgtcctgc atctggccgc cgaggctggt tcggtcgagg
atctggaact

1381 cgaagacgtt ctgaagatcg gctacaagaa catcaagtgc gtcgagtcgg
gcggcccgga

1441 gccggggggtc ggctgcgccc ggcgeggcgt catcacctcg atcaacttcc
tggaaagaaa

1501 cggcgcctac gacgacgtgg attatgtgtc ctacgacgtg ctgggcgacg
tggtgtgagg

1561 cggtttcgcc atgcccctcc gtgaaaacaa agcccaggaa atctacatcg
tcatgtccgg

1621 **cgagatgatg gogotctacg** ccgccaacaa catcgccaag ggcattttga
agtacgccc

1.2 Análisis del patrón de restricción de la secuencias *nifH* de las bacterias fijadoras de nitrógeno por el programa WebCutter 2.0.

Klebsiella

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	2	70 158	gg/cc
HhaI	4	140 145 181 229	gcg/c
MspI	3	152 160 344	c/cgg
RsaI	1	364	gt/ac

Frankia alni

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	5	73 125 158 185 223	gg/cc
HhaI	4	48 181 229 318	gcg/c
MspI	6	152 160 166 182 224 341	c/cgg
RsaI	1	232	gt/ac

Nostoc sp

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HhaI	2	181 229	gcg/c
MspI	3	122 167 182	c/cgg
RsaI	1	59	gt/ac

Acidithiobacillus ferrooxidans

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	5	13 73 158 229 352	gg/cc
HhaI	4	48 181 241 315	gcg/c
MspI	5	80 152 166 303 338	c/cgg
RsaI	1	358	gt/ac

Azotobacter chroococcum

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	6	46 70 158 185 319 358	gg/cc
HhaI	2	181 229	gcg/c

MspI	4	80 152 166 344	
RsaI	1	364	c/cgg gt/ac

Azoarcus sp

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	5	46 70 185 319 358	gg/cc
HhaI	2	181 229	gcg/c
MspI	5	80 152 160 167 182	c/cgg
RsaI	1	364	gt/ac

Bradyrhizobium

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	2	70 185	gg/cc
HhaI	3	181 229 318	gcg/c
MspI	6	80 152 160 166 182 341	c/cgg

Burkholderia sp

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	3	46 70 158	gg/cc
HhaI	4	181 188 229 357	gcg/c
MspI	4	160 166 182 341	c/cgg

Alcaligenes faecalis

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	5	13 70 79 226 319	gg/cc
HhaI	2	48 181	gcg/c
MspI	6	80 122 160 166 182 344	c/cgg
RsaI	1	84	gt/ac

Rhodobacter sphaeroides

Table by Enzyme Name

Enzyme	No.	Positions	Recognition
--------	-----	-----------	-------------

name	cuts of sites	sequence
HaeIII	3 13 159 185	gg/cc
HhaI	4 181 229 318 357	gcg/c
MspI	3 152 160 166	c/cgg

Rhizobium sp

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	4	13 70 158 355	gg/cc
HhaI	5	48 181 188 229 318	gcg/c
MspI	5	80 152 160 166 341	c/cgg

Azospirillum brasilense

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	3	13 185 316	gg/cc
HhaI	4	48 181 229 357	gcg/c
MspI	6	80 152 160 166 182 341	c/cgg

Desulfotomaculum nigrificans

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HaeIII	4	152 313 334 352	gg/cc
HhaI	1	175	gcg/c
MspI	4	154 176 300 338	c/cgg

Anabaena variabilis

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
HhaI	2	51 184	gcg/c
MspI	4	125 170 185 410	c/cgg
RsaI	2	62 419	gt/ac

1.3 Análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento de 524 pb del DNAr 16S para la cepa referencia ChI1 y las muestra de suelo Col-2 por el análisis informático BLAST.

rRNA BLAST results

your BLAST query:

```
blastall -T T -p blastn -d rrna -e 10.0 -G 0 -E 0 -X 0 -W 0 -q -3 -r 1 -m 0 -v 100 -b 100
```

If you believe this command is incorrect, you can see the script that generated it [here](#), or you can contact [Jan Wuyts](#).

BLAST results:

BLASTN 2.2.2 [Jan-08-2002]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query=

(493 letters)

Database. SSU1LSU rRNA

21,784 sequences; 34,990,536 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
Frankia_sp._L40619	924	0.0
Frankia_sp._L40617	924	0.0
Frankia_sp._AF063642	924	0.0
Frankia_sp._AF063640	924	0.0
Frankia_sp._L40618	924	0.0
Frankia_sp._L40956	916	0.0
Frankia_sp._U60287	900	0.0
Frankia_sp._U60286	900	0.0
Frankia_sp._M88466	900	0.0
Frankia_sp._FE12_AF158687	900	0.0
Frankia_sp._L40610	892	0.0
Frankia_sp._U60285	888	0.0
Frankia_sp._U60284	886	0.0
Frankia_sp._L40622	886	0.0
Frankia_sp._L40613	884	0.0
Frankia_sp._M58598	884	0.0
Frankia_sp._M55343	884	0.0
Frankia_sp._U72718	884	0.0
Frankia_sp._L40612	872	0.0
Frankia_sp._AF063641	868	0.0
Frankia_sp._U72717	864	0.0
Frankia_sp._AF063639	864	0.0
Frankia_sp._U69265	841	0.0
Frankia_sp._L40616	841	0.0
Frankia_sp._FrCam_AF050758	833	0.0
Frankia_sp._FrCth_AF050759	833	0.0
Frankia_sp._AF034776	825	0.0
Frankia_sp._L11307	817	0.0
Acidothermus_cellulolyticus_AJ007290	805	0.0
Frankia_sp._L41048	769	0.0
Unidentified_actinomycete_L43598_L43598	753	0.0
Geodermatophilus_sp._X92366	737	0.0
	730	0.0

Microsphaera multipartitus_D50066	728	0.0
Geodermatophilus_sp._X92360	728	0.0
Geodermatophilus_sp._X92362	720	0.0
Frankia_sp._X53208	714	0.0
Streptomyces_espinosus_X80826	714	0.0
Streptomyces_sp._X81574	714	0.0
Geodermatophilus_obscurus_X92355	712	0.0
Sporichthya_polymorpha_AB025317	706	0.0
Geodermatophilus_obscurus_X92357	706	0.0
Streptomyces_sp._A25_AF184081	706	0.0
Geodermatophilus_obscurus_L40620	706	0.0
Saccharothrix_cryophilis_AF114806	706	0.0
Geodermatophilus_obscurus_X92359	704	0.0
Cryptosporangium_sp._AB006168	702	0.0
Cryptosporangium_sp._AB006166	702	0.0
Cryptosporangium_japonicum_D85466	698	0.0
Streptomyces_thermocarboxydus_AJ249627	698	0.0
Sporichthya_polymorpha_X72377	698	0.0
Streptomyces_sp._NT_AJ001433	698	0.0
Geodermatophilus_sp._X92363	696	0.0
Amycolatopsis_thermoflava_AF052390	696	0.0
Streptomyces_thermocarboxydus_U94490	690	0.0
Amycolatopsis_sp._AJ000285	690	0.0
Streptomyces_pseudogriseolus_X80827	690	0.0
Streptomyces_sp._CHR3_AF026080	690	0.0
Modestobacter_multiseptatus_Y18646	688	0.0
Actinosynnema_mirum_X84447	688	0.0
Nocardioides_thermolilacinus_AF005019	682	0.0
Nocardioides_thermolilacinus_AF005018	682	0.0
Streptomyces_thermocarboxydovorana_U94489	682	0.0
Streptomyces_thermocarboxydovorana_U94488	682	0.0
Streptomyces_thermocarboxydovorana_U94487	682	0.0
Streptomyces_caelestis_X80824	682	0.0
Streptomyces_caelestis_AJ399467	682	0.0
Streptomyces_purpurascens_AJ399486	682	0.0
Geodermatophilus_sp._X92361	682	0.0
Streptomyces_sp._Y15494	682	0.0
Streptomyces_vellosus_X99942	682	0.0
Streptomyces_fumanus_AJ399463	682	0.0
Geodermatophilus_sp._X92358	682	0.0
Streptomyces_pallidus_AJ399492	682	0.0
Streptomyces_thermotolerans_AJ399482	682	0.0
Streptomycetaceae_X95470	682	0.0
Streptomyces_cyaneus_AJ399470	682	0.0
Streptomyces_coeruleofuscus_AJ399473	682	0.0
Saccharothrix_flava_AF114808	680	0.0
Saccharothrix_aerocolonigenes_AF114804	680	0.0
Actinosynnema_pretiosum_subsp._AF114800	680	0.0
Amycolatopsis_methanolica_X54274	678	0.0
Streptomyces_sp._NRRL_5799_AJ391814	674	0.0
Streptomyces_hawaiiensis_AJ399466	674	0.0
Streptomyces_coelicolor_D_AL353862	674	0.0
Streptomyces_coelicolor_D_AL079345	674	0.0
Unidentified_actinomycete_L43597_L43597	674	0.0
Streptomyces_coelicolor_C_AL353861	674	0.0
Streptomyces_coelicolor_A_AL356612	674	0.0
Streptomyces_coelicolor_2_D_AL353862	674	0.0
Streptomyces_lividans_B_Y00484	674	0.0
Streptomyces_thermoalkalitolerans_AJ000284	674	0.0
Amycolatopsis_orientalis_X81573	674	0.0
Streptomyces_tendae_D63873	674	0.0
Streptoverticillium_mashuense_X79323	674	0.0
Streptomyces_canescens_Z76684	674	0.0
Streptomyces_sampsonii_Z76680	674	0.0
Geodermatophilus_obscurus_X92356	674	0.0
Streptomyces_limosus_Z76679	674	0.0
Streptomyces_sampsonii_D63871	674	0.0
Streptomyces_rutgersensis_Z76688	674	0.0

>Frankia_sp._L40619

