

UCH-FC
MAO-B
B 826
C.1

DIVERSIDAD GENETICA Y ESPECIFICIDAD DE
HUESPED DE LAS CEPAS DE *Frankia* AISLADAS DE
LA FAMILIA RHAMNACEAE

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias biológicas con mención en Genética

Facultad de Ciencias



Lorena Andrea Bravo Ramírez

Diciembre, 2002

Director de Tesis: Dra. Margarita Carú M.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por el candidato:

Lorena Andrea Bravo Ramirez

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Genética, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de octubre del 2002.

Director de Tesis:

Dra. Margarita Carú M

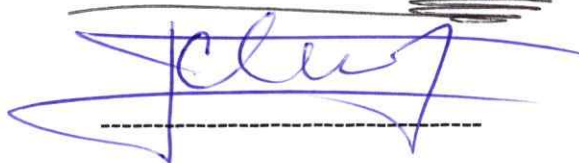
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Carú M.', written over a horizontal dashed line.

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Liliana Cardemil

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Liliana Cardemil', written over a horizontal dashed line.

Dr. Claudio Martinez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. Martinez', written over a horizontal dashed line.

A mi esposo

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma participaron para que esta Tesis se desarrollara.

Un especial agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Margarita Carú que me brindó apoyo y me entregó conocimiento.

Al Dr. D. Benson por su interés en este proyecto y por la secuenciación del rDNA 16S.

A Angel Cabello y Ana Sepúlveda por proveer las plantas para los ensayos de inoculación cruzada, y por el cuidado de ellas.

A Dionisia Sepúlveda por su amistad y consejos para que todo esto tuviera un buen final. Por acogerme desde un principio en el laboratorio y por mostrarme el mundo de la *Frankia*.

A todas las personas que en algún momento fueron compañeros de laboratorio o de almuerzo durante el transcurso de esta tesis, Gloria, Rafael, Mónica, Pilar y Mauricio. Gracias por los momentos de amistad y aunque algunos no estén los momentos vividos perduran.

Un muy especial agradecimiento a Sandra y Juanita que de la noche a la mañana se convirtieron en "tías", por su dedicación y paciencia, un abrazo. Sin ustedes todo habría sido mucho más difícil.

A todos que en algún momento me ayudaron cuando las cosas no se veían tan claras. En especial al Dr. Claudio Martínez, Dr. Victor Cifuentes y Dra. Madeleine Lambrot.

A mis padres, que a pesar de la distancia nunca han dejado de estar interesados en lo que hago y quienes me inculcaron la perseverancia frente a la adversidad.

Finalmente, a mi esposo Jorge y mis hijos Felipe y Lukas, que me llenan de orgullo y amor.

INDICE DE MATERIAS

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1. <i>Frankia</i> morfología	1
1.2. Plantas actinorrícicas	2
1.3. Especificidad de Huésped	5
1.4. Aislamiento y cultivo de cepas de <i>Frankia</i>	6
1.5. Status taxonómico de <i>Frankia</i>	7
1.6. Diversidad genética	8
2. MATERIALES Y METODOS	14
2.1. Materiales	14
2.1.1. Cepas de <i>Frankia</i> estudiadas	14
2.1.2. Reactivos	14
2.2. Métodos	16

2.2.1. Condiciones de Cultivo	16
2.2.2. Preparación de extracto crudo	16
2.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	17
2.2.4. Análisis del polimorfismo enzimático multilocus	21
3. Secuenciación y análisis de 16S rDNA	22
4. Determinación de infectividad de las cepas de <i>Frankia</i> (ensayo de inoculación)	24
4.1. Preparación del inoculo	24
4.2. Producción de plantas y ensayo de infectividad	24
4.3. Infectividad y efectividad	25
4.4. Actividad de nitrogenasa	25
3. RESULTADOS	27
3.1. Polimorfismo Enzimático Multilocus	27
3.1.1. Sistemas Enzimáticos	27
3.1.2. Análisis del polimorfismo enzimático multilocus	42
3.2. Análisis del rDNA 16S	47
3.3. Especificidad de huésped	54
3.3.1. Ensayo de nodulación (infectividad)	54
3.3.2. Ensayo de efectividad	57
4. DISCUSION	60
4.1. Polimorfismo multienzimático	60

4.2. Análisis del rDNA 16S	67
4.3. Especificidad de huésped	69
5. CONCLUSIONES	77
6. APENDICE	79
7. BIBLIOGRAFIA	81

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Fig. 1 : Patrones electroforéticos de DIA.	30
Fig. 2 : Patrones electroforéticos de MNR.	31
Fig. 3 : Patrones electroforéticos de MDH.	33
Fig. 4 : Patrones electroforéticos de α -EST.	34
Fig. 5 : Patrones electroforéticos de β -EST.	36
Fig. 6 : Patrones electroforéticos de IDH.	38
Fig. 7 : Patrones electroforéticos de PGI.	39
Fig. 8 : Patrones electroforéticos de PGM.	41
Fig. 9 : Dendrograma construido usando coeficientes de similitud de Jaccard basado en la variación de ocho sistemas enzimáticos y un análisis de cluster UPGMA.	46
Fig. 10 : Arbol filogenético basado en secuencias del rDNA 16S obtenidas por el algoritmo de Neighbor Joining usando el coeficiente de Kimura (K2P). Los números en las ramas corresponden a valores de bootstrap.	53

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Familias y géneros de plantas actinorrhizas.	3
Tabla 2 : Planta huésped y localidad de cepas de <i>Frankia</i> utilizadas en este estudio.	15
Tabla 3 : Fenotipos electroforéticos de las cepas de <i>Frankia</i> .	28
Tabla 4 : Sistemas enzimáticos adicionales.	43
Tabla 5 : Matriz de distancia.	45
Tabla 6 : Cepas del rDNA 16S utilizadas en este estudio.	49
Tabla 7 : Alineamiento de la secuencia parcial del rDNA 16S obtenida de cepas <i>Frankia</i> mediante el método de ClustalW. Se muestran los nucleótidos distintos.	50
Tabla 8 : Porcentaje de nodulación inducida por cepas de <i>Frankia</i> .	55
Tabla 9 : Infectividad y efectividad de las cepas de <i>Frankia</i> en simbiosis.	58

ABREVIATURAS

ADH	alcohol deshidrogenasa
ALADH	alanina deshidrogenasa
BAP	medio salino para <i>Frankia</i>
DIA	diaforasa
DPIP	2,6-diclorofenolindofenol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EST	esterasa
GLYD	glicerol deshidrogenasa
HISDH	histidinol deshidrogenasa
HSG	grupo de especificidad de huésped
IDH	isocitrato deshidrogenasa
IGS	espaciador intergénico (Intergenic Spacer)
LEUDH	leucina deshidrogenasa
MDH	malato deshidrogenasa
MNR	menadiona reductasa
NADH	nicotinamida adenina dinucleotido (forma reducida)
NADP	β -nicotinamida adenina dinucleotida fosfato

NBT	nitro-blue tetrazolium
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida (Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PGI	fosfoglucoisomerasa
PGM	fosfoglucomutasa
PMS	N-Metildibenzopirazina metil sulfato
RAPD-PCR	polimorfismo del DNA por amplificación al azar (Randomly Amplified DNA)
rDNA	DNA ribosomal
RFLP	polimorfismo de largo de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
TRIS	tris (hidrometil) aminometano
UPGMA	unweighted pair group mean average

RESUMEN

Frankia es un actinomiceto fijador de nitrógeno que establece una asociación simbiótica con plantas actinorrícicas formando nódulos radiculares. Rhamnaceae es una de las familias actinorrícicas y sus géneros se encuentran formando parte del matorral esclerofítico de Chile central. La familia está compuesta por 7 géneros, *Trevoa*, *Colletia*, *Retanilla*, *Discaria*, *Talguenea* y *Ceanothus*, donde algunos géneros tal como *Talguenea* son endémicas.

La extensión de diversidad genética de cepas de *Frankia* aisladas de esta familia se estudió mediante polimorfismo enzimático multilocus y la secuencia del rDNA 16S. Las relaciones filogenéticas se establecieron entre miembros de *Frankia* aislados de Rhamnaceae y otras familias actinorrícicas. Además, la capacidad de cepas nativas de infectar y fijar nitrógeno en simbiosis con su planta huésped y plantas de la familia Elaeagnaceae se determinó por ensayos de inoculación cruzada para determinar el grupo de infectividad.

El análisis de 8 sistemas enzimáticos usando electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con tinción específica para cada enzima mostró que cepas de *Frankia* representativas de 4 de las 8 familias actinorrícicas se distribuían en 3 grupos principales; un grupo con todas las cepas aisladas de plantas pertenecientes a la familia Rhamnaceae; un segundo grupo con las cepas aisladas de plantas pertenecientes a la familia Betulaceae, y un tercer grupo con cepas de la familia Casuarinaceae.

Por otra parte, el análisis del rDNA 16S mostró tres clusters. El primero era un cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae, lo cual corrobora lo encontrado anteriormente de una baja variabilidad genética entre estas familias. El género *Ceanothus* sp. (Rhamnaceae) formó un segundo cluster con la familia Rosaceae. Un tercer cluster agrupó representantes de las familias Myricaceae, Betulaceae y Casuarinaceae.

Los ensayos de inoculación cruzada mostraron que cepas de *Frankia* aisladas de plantas rhamnáceas eran capaces de infectar plantas hospederas pertenecientes a las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae. Las cepas ensayadas eran infectivas y efectivas, siendo capaces de nodular y fijar nitrógeno. Esto apoya la hipótesis que cepas derivadas de las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae constituyen un grupo de inoculación cruzada.

ABSTRACT

Frankia is a nitrogen fixing actinomycete, which establishes a symbiotic association with actinorhizal plants forming root nodules. Rhamnaceae is one of the actinorhizal families and some of its genera are found forming part of the esclerofitic matorral of central Chile. The family is composed of 7 genera, *Trevoa*, *Colletia*, *Retanilla*, *Discaria*, *Talguenea* and *Ceanothus*, where some genera such as *Talguenea* are endemic.

The extent of the genetic diversity of *Frankia* strains isolated from this actinorhizal family was studied by multilocus enzymatic polymorphism and 16S rDNA sequence. The phylogenetic relationships were established between members of *Frankia* isolated from the Rhamnaceae and other actinorhizal families. Furthermore, the capacity of native strains to infect and fix nitrogen in symbiosis with their host plant and plants from the Elaeagnaceae family was assessed by cross inoculation assays to determine their infectivity group.

The analysis of 8 enzyme systems using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with specific staining for each enzyme showed that *Frankia* strains representing 4 of the 8 actinorhizal families were distributed in 3 main groups; a group containing strains isolated from plants belonging to the Rhamnaceae family; a second group with strains isolated from plants from the Betulaceae family, and a third group containing strains belonging to the Casuarinaceae family.

Likewise, the 16S rDNA sequence analysis showed three main clusters. The first was a Rhamnaceae/Elaeagnaceae cluster, supporting the previous finding of a low degree of genetic variability between these two families. The genus *Ceanothus* sp. (Rhamnaceae) formed a second cluster with a strain isolated from the Rosaceae family. A third cluster grouped representatives of the Myricaceae, Betulaceae and Casuarinaceae families as previously published.

The cross inoculation assays found that *Frankia* strains isolated from rhamnaceous plants were able to infect host plants belonging to the Rhamnaceae and Elaeagnaceae families. The strains assayed were both infective and effective, being capable of nodulating and fixing nitrogen. This supports the hypothesis that strains derived from Rhamnaceae and Elaeagnaceae plants constitute a cross inoculation group.

1. INTRODUCCION

1.1. *Frankia* morfología

Frankia, único género representante de la familia Frankiaceae (Normand *et al.*, 1996) son bacterias filamentosas, heterotróficas y gram positivas que pertenecen al orden Actinomycetales, aisladas por primera vez por Callaham *et al.*, en 1978. Los criterios taxonómicos más importantes para establecer el status genérico de este actinomicete son su morfología filamentosa (Newcomb & Wood, 1987), su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en vida libre (*in vitro*) o en simbiosis (*in planta*) con plantas superiores, la pared celular tipo III (presencia de ácido meso-diaminopimélico, alanina, ácido glutámico, ácido murámico y glucosamina), fosfolípidos de tipo PI, y un alto contenido de G + C en el rango de 68-72% (An *et al.*, 1983; Lechevalier, 1994).

Frankia se diferencia en 3 tipos celulares i) hifas ramificadas y septadas, ii) vesículas NIR (Nitrogen Reducing vesicles), y iii) esporangios multiloculares. Estas estructuras se observan tanto en cultivo puro como en los nódulos radiculares, excepto los esporangios que se forman en algunos nódulos, denominados sp+ (Schwintzer, 1990). Las hifas están divididas internamente por septas y constituyen la principal estructura del micelio.

Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, las hifas se diferencian generando vesículas NIR, estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno ya que contienen el complejo nitrogenasa, el cual es responsable de la reducción de nitrógeno molecular en amonio (Meesters, 1987). En cultivo, las vesículas son estructuras esféricas

de 2-3 μm de diámetro que se encuentran unidas al micelio por un corto tallo a la hifa parental. La forma de las vesículas producidas en nódulos radiculares es determinada por la planta huésped (Lalonde, 1979; Baker & Seling, 1984). En el caso de las familias Betulaceae, Elaeagnaceae y Rhamnaceae, excepto el género *Ceanothus*, las vesículas son esféricas y septadas, en *Ceanothus* tienen la forma alargada y no son septadas, mientras que en *Coriaria*, *Comptonia* y *Datisca* las vesículas tienen forma de mazo (Torrey, 1985). La pared celular de las vesículas está formada por lípidos hopanoides que actúan como una barrera para impedir la libre difusión de oxígeno al sitio de actividad nitrogenasa y así evitar su oxidación (Berry, 1994). Aún cuando las vesículas son una respuesta de *Frankia* a la falta de nitrógeno, se han reportado cepas que desarrollan vesículas en medios de cultivos que contenían nitrógeno combinado (Gauthier *et al.*, 1984; Carú, 1993).

Las hifas también se pueden diferenciar, dependiendo de las condiciones de cultivo, a esporangios y esporas, las cuales se producen en la etapa tardía de crecimiento (Carú *et al.*, 1997). Los esporangios aparecen como estructuras terminales o intercalares en la hifa. En la etapa inicial se produce una hinchazón de las hifas, para luego ser septadas en forma transversal y longitudinal para dar origen a las esporas. *Frankia* no produce estructuras miceliales aéreas.

1.2. Plantas actinorrícicas

Frankia infecta y nodula un amplio rango de angiospermas dicotiledóneas conocidas como plantas actinorrícicas; estas incluyen aproximadamente 270 especies en 24 géneros pertenecientes a 8 familias (Tabla 1) (Schwencke & Carú, 2001). En la familia

Tabla 1. Familias y géneros de plantas actinorróicas^a

Sub-clase ^b	Familia	Género	Distribución
Hamamelidae	Betulaceae	<i>Alnus</i>	Europa, Asia, América
	Casuarinaceae	<i>Allocasuarina</i>	Australia
		<i>Casuarina</i>	Australia, Asia tropical
		<i>Ceuthostoma</i>	Australia
<i>Gymnostoma</i>		Sumatra a Nueva Caledonia, Fiji, Australia	
Myricaceae	<i>Comptonia</i>	Norteamérica	
	<i>Myrica</i>	Amplia distribución en regiones tropicales y templadas	
Rosidae	Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i>	Europa, Asia, Norteamérica
		<i>Hippophae</i>	Europa, Asia
		<i>Shepherdia</i>	Norteamérica
	Rhamnaceae	<i>Ceanothus</i>	Norteamérica
		<i>Colletia</i>	Sudamérica
		<i>Discaria</i>	Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda
		<i>Kentrothamhus</i>	Bolivia, Argentina
		<i>Retanilla</i>	Sur de Sudamérica
		<i>Talguenea</i>	Chile
		<i>Trevoa</i>	Sudamérica
Rosaceae	<i>Cercocarpus</i>	Norteamérica, México	
	<i>Chamaebatia</i>	Norteamérica	
	<i>Cowania</i>	México, Norteamérica	
	<i>Dryas</i>	Artico, zonas templadas	
	<i>Purshia</i>	Norteamérica	
Magnoliidae	Coriariaceae	<i>Coriaria</i>	Mediterráneo, Japón, China, Nueva Zelanda, Chile, México
Dilleniidae	Datisceae	<i>Datisca</i>	Mediterráneo a Himalayas, Asia Central, Norteamérica

^a Según Baker & Schwintzer (1990), y Swensen (1996).^b Clasificación propuesta por Cronquist (1988)

Rhamnaceae se han encontrado 7 géneros que forman nódulos radiculares fijadores de nitrógeno: *Trevoa*, *Colletia*, *Retanilla*, *Discaria*, *Talguenea*, *Kentrothamus* y *Ceanothus* (Bond & Becking, 1982; Cruz-Cisneros & Valdés, 1991; Delwiche *et al.*, 1965; Medan & Tortosa, 1981; Rundel & Neel, 1978; Silvester *et al.*, 1985). Algunos de estos géneros se encuentran formando parte del matorral esclerófilo de Chile Central, con algunas especies endémicas como *Talguenea quinquinervia* (Silvester *et al.*, 1985).

Las plantas actinorrícicas tienen una amplia distribución encontrando representantes en todos los continentes excepto en la Antártica (Baker & Schwintzer, 1990). Las plantas actinorrícicas de los géneros *Alnus*, *Casuarina* y *Elaeagnaceae* exhiben la mayor distribución ya que han sido introducidas en casi todos los continentes, exceptuando Africa donde se encuentran solo algunas especies de *Myrica* (Baker & Mullin, 1992).

Las plantas actinorrícicas se consideran especies pioneras, capaces de colonizar sitios deteriorados o erosionados y posiblemente contribuyen a las sucesiones vegetales primarias estabilizando el suelo y aumentando su contenido de nitrógeno (Baker & Mullin, 1992). Las plantas actinorrícicas de amplia distribución se encuentran tanto en regiones templadas como también en los trópicos y áreas subárticas y están adaptadas a zonas marginales con condiciones limitantes de humedad, temperatura y pH. La asociación simbiótica con *Frankia*, hace a las plantas actinorrícicas buenos candidatos en la reforestación y recuperación de suelos de baja fertilidad y limitante en nitrógeno.

Las tasas de fijación de nitrógeno encontrada para la simbiosis *Frankia*-plantas actinorrícicas son comparables a los valores obtenidos por la simbiosis de *Rhizobium*-leguminosas (Dawson, 1986; Torrey, 1978).

1.3. Especificidad de Huésped

La mayoría de las cepas de *Frankia* descritas en la literatura, exhiben un amplio rango de huésped. Los estudios de inoculación cruzada permiten definir tres grupos de especificidad de huésped (HSG): el HSG1 incluye cepas que nodulan *Alnus*, *Comptonia* y *Myrica*; HSG2 incluye aquellas cepas que nodulan *Casuarina*, *Gymnostoma* y algunas especies de *Allocasuarina* y HSG3 corresponde a cepas que infectan *Elaeagnus*, *Hippophae* y *Shepherdia* (Baker, 1987; Baker & Mullin, 1992).

Por otra parte algunos géneros vegetales exhiben un grado distinto de promiscuidad, un término utilizado para describir la tolerancia de la planta para establecer simbiosis con un amplio rango de cepas de *Frankia* genéticamente muy distintas (Baker, 1987; Torrey & Racette, 1989).

Poco se conoce sobre la especificidad de huésped de las cepas aisladas de rhamnáceas y si ellas pudiesen incluirse en algunos de los grupos de especificidad descritos o constituir un grupo independiente. La razón de este desconocimiento ha sido principalmente debido a la falta de cepas puras, ya que éstas han sido difíciles de obtener en cultivo (Torrey, 1990). Hasta la fecha, hay sólo tres trabajos que incluyen cepas derivadas de rhamnáceas en estudios de infectividad: aquellos reportados por Gauthier *et al.*, (1984) que señalan que dos especies de los géneros *Hippophae* y *Elaeagnus* (Elaeagnaceae) son noduladas por *Frankia* aislada de *Colletia spinosissima*, y Baker (1987) que reportó que la cepa de *Frankia* Wgcc1.17 aislada de *Colletia cruciata* fue infectiva sobre *Elaeagnus angustifolia*, *Hippophae rhamnoides* y *Myrica cerifera*. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que algunas cepas de *Frankia* tales como TtI42 aislada de *Trevoa trinervis* son capaces de nodular plantas de *Trevoa*

trinervis, *Retanilla ephedra* y *Talguenea quinquinervis* (Carú & Cabello, 1999). Estos antecedentes sugieren que las cepas de *Frankia* derivadas de la familia Rhamnaceae podrían tener un mayor rango de huésped, nodulando plantas pertenecientes a otras familias como Elaeagnaceae y podrían constituir un grupo de infectividad cruzada al menos entre los distintos géneros de la familia Rhamnaceae (Carú & Cabello, 1999). Por otra parte, el análisis filogenético basado en la secuencia del rDNA 16S muestra que las cepas de *Frankia* derivadas de rhamnáceas exhiben una baja variabilidad genética y que se agrupan con las cepas de *Frankia* aisladas de la familia Elaeagnaceae formando un cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae (Clawson *et al.*, 1998).

1.4. Aislamiento y cultivo de cepas de *Frankia*

El aislamiento de cepas de *Frankia* ha sido lento debido al bajo crecimiento y la presencia de contaminantes de rápido crecimiento presente en las muestras nodulares. A partir de un homogenizado de nódulos es posible obtener colonias de *Frankia* después de 2-4 semanas. La identificación de una colonia de *Frankia* depende de una verificación microscópica de esporangios y/o vesículas además de hifas ramificadas.

Frankia es una bacteria heterotrófica que utiliza ácidos orgánicos de cadena corta como fuente de carbono los cuales incluyen piruvato y propionato y/o algunos carbohidratos tales como glucosa y sacarosa. La mayoría de las cepas de *Frankia* son microaerofílicas y por lo tanto crecen mejor en condiciones estáticas o con una leve agitación, su crecimiento es muy lento y la temperatura óptima está entre los 25°– 30°C.

Cepas de *Frankia* aisladas de nódulos radiculares de plantas de la familia Rhamnaceae han sido aisladas y caracterizadas (Carú *et al.*, 1990; Carrasco *et al.*, 1992; Carú, 1993; Carrasco *et al.*, 1995). Todas ellas presentan las características morfológicas descritas para el género, es decir hifa septada, vesículas y esporangios. Fijan nitrógeno en vida libre y en simbiosis y utilizan principalmente glucosa como fuente de carbono (Carú, 1993; Carrasco *et al.*, 1995). Cultivos estáticos de cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae muestran una fase lag de duración variable seguido por un crecimiento exponencial (Carú, 1993). Al fin de esta fase de crecimiento hay una rápida pérdida de biomasa, un efecto que se puede explicar por la autólisis de micelio probablemente debido a actividades proteolíticas que se han detectado en esta etapa (Benoist *et al.*, 1992).

1.5. Status taxonómico de *Frankia*

Hasta ahora, la designación del género *Frankia* es ampliamente aceptado, sin embargo, la designación de especie con relación a la planta huésped de la cual derivan es aún controversial. Si bien, la capacidad de nodulación de las cepas está limitada a ciertos grupos de especificidad de huésped, ésta no es determinante para la clasificación a nivel de especie. En un primer intento para clasificar las cepas de *Frankia* Baker (1987) utilizó ensayos de inoculación cruzada. Estos ensayos resultaron en la designación de los tres grupos de especificidad de huésped antes mencionados. Sin embargo, encontró que algunas cepas eran capaces de infectar especies fuera de los tres grupos establecidos, indicando un grado de promiscuidad dentro de las cepas de *Frankia* estudiadas.

Un método alternativo es la hibridización DNA-DNA con el cual se describieron 9 especies genómicas para *Frankia* de las cuales tres especies genómicas corresponden al HSG 1; cinco especies son compatibles con miembros del grupo de Elaeagnaceae (HSG 3) y una con Casuarina (HSG 2) (Fernandez *et al.*, 1989).

1.6. Diversidad genética

En general, la identificación de grupos de cepas de *Frankia* fenotípicamente relacionados ha resultado una tarea difícil, distintos enfoques han permitido evaluar el grado de diversidad genética de las cepas aisladas, entre ellos se mencionan: estudios fisiológicos (Ruan & Wang, 1991); capacidad de nodulación (Baker, 1987; Nazaret *et al.*, 1989); patrones de proteínas totales (Benson *et al.*, 1984); estudios serológicos (Baker *et al.*, 1981); análisis isoenzimático (Gardes *et al.*, 1987; Girgis & Schwencke, 1993); utilización de fuentes de carbono (Shipton & Burggraaf, 1982; Sellsted *et al.*, 1994); patrones de restricción (An *et al.*, 1985; Bloom *et al.*, 1989; Beyazova & Lechevalier, 1992) y análisis de RFLP (Nittayajarn *et al.*, 1990; Jamann *et al.*, 1993). Todos estos métodos revelan la existencia de diversidad genética entre cepas de *Frankia* aisladas de diferentes familias de plantas. Análisis de cluster utilizando algunos de estos marcadores genéticos como los RFLP de los genes *nifHDK* y región ribosomal (*rrn*) (Jamann *et al.*, 1993) y los análisis de restricción de DNA genómico (Dobritsa & Stupar, 1992) identifican grupos relacionados con su especificidad de huésped.

La caracterización mediante marcadores enzimáticos multilocus de 40 cepas de *Frankia* pertenecientes a los grupos de *Alnus* y *Elaeagnus* revela que existe una alta heterogeneidad. Los análisis de cluster identificaron tres grupos principales, dos de ellos

incluían cepas del HSG1, mientras gran parte de las cepas aisladas de *Elaeagnus* se incluyen en el HSG3 (Gardes *et al.*, 1987).

Un enfoque adicional es el análisis de secuencias de los genes que codifican para el RNA ribosomal 16S (rDNA) el cual se usa para la identificación molecular y en el estudio de las relaciones filogenéticas entre cepas de *Frankia* aisladas a partir de nódulos de plantas actinorrhizas de las diferentes familias (Nazaret *et al.*, 1991; Benson *et al.*, 1996, Clawson *et al.*, 1998). Las relaciones entre cepas de *Frankia* que infectan plantas de las familias Coriariaceae (Benson *et al.*, 1996), Datisceae (Mirza *et al.*, 1994), Rhamnaceae (Benson *et al.*, 1996), Rosaceae (Benson *et al.*, 1996), Elaeagnaceae (Clawson *et al.*, 1998) y Myricaceae (Clawson & Benson, 1999) se han estudiado utilizando la secuencia del rDNA 16S o regiones de ésta. Una estimación de la variabilidad en estas cepas de *Frankia* no cultivadas, revela una baja diversidad en algunas familias, tal como en Rhamnaceae y Elaeagnaceae, a pesar de la amplia distribución geográfica de las muestras utilizadas (Clawson *et al.*, 1998).

Arboles filogenéticos generados del alineamiento de secuencias del rDNA 16S muestran tres grupos principales de *Frankia*: i) el grupo de *Alnus*, incluye cepas que infectan plantas de las familias Betulaceae, Casuarinaceae y Myricaceae, ii) el grupo de *Elaeagnus*, incluye microsimbiontes de las familias Elaeagnaceae y Rhamnaceae y algunas cepas de *Gymnostoma*, iii) el grupo *Dryas* que contiene microsimbiontes de las familias Rosaceae, Coriariaceae, Datisceae y del género *Ceanothus* (Rhamnaceae). Un cuarto grupo de cepas denominadas “*Frankia*-like” incluye actinomicetes de fenotipo Nod-/Fix- (Clawson & Benson, 1999; Benson & Clawson, 2000). Análisis adicionales realizados con la secuencia de *glnA* (glutamina sintetasa), un gen más variable han

confirmado la existencia de los tres grupos principales en *Frankia* (Benson & Clawson, 2000).

El alineamiento de un fragmento de 378 pb de rDNA 16S de *Frankia* asociadas a plantas de las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae, con la excepción de aquellas que establecen simbiosis con *Ceanothus americanus* y *C. griseus* forman un clado muy homogéneo. Este clado se caracteriza por presentar una delección de 2pb en las posiciones 50 y 51 comparado con secuencias de *Frankia* infectivas en otras familias (Clawson *et al.*, 1998).

En estudios de variabilidad genética de cepas estrechamente relacionadas como aquellas derivadas de una misma familia de plantas o de un único huésped requiere utilizar marcadores más polimórficos. Así los perfiles de PCR-RFLP de las regiones intergenicas IGS entre 16S-23S rDNA (Rouvier *et al.*, 1996; Mosquera, 2002) y la amplificación por PCR de regiones genómicas utilizando partidores arbitrarios (RAPD) permiten la discriminación de cepas de *Frankia* cercanamente emparentadas (Sellsted *et al* 1992; Mosquera, 2002).

Los marcadores enzimáticos también han sido útiles para identificar y detectar polimorfismo genético entre cepas relacionadas, ya que cepas derivadas de un mismo huésped exhiben diferentes fenotipos enzimáticos (Faure-Raynaud *et al.*, 1990). Asimismo, cepas de *Frankia* aisladas de plantas de la familia Casuarinaceae presentan variación en los patrones electroforéticos de esterasas y aminopeptidasas intracelulares (Girgis & Schwencke, 1993).

En este estudio se utilizó un grupo de cepas aisladas de la familia Rhamnaceae, las cuales presentan fenotipos morfológicos y fisiológicos muy similares en cultivo (Carú,

1993, 1995). Además estas cepas están filogenéticamente muy relacionadas (Clawson *et al.*, 1998). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que existe una importante similitud genética en el grupo de cepas derivadas de la familia Rhamnaceae utilizando marcadores moleculares del tipo RFLP (Mosquera, 2002). Esta menor variabilidad genética puede ser en parte consecuencia del proceso de aislamiento posiblemente debido a la fuerte selección que se les impone al cultivo *in vitro* (en vida libre) ya que se seleccionan aquellas que son más eficientes en su crecimiento en los medios de cultivo empleados. Este fenómeno es frecuente, en particular para cepas de *Frankia* que fueron aisladas de plantas actinorrhizas creciendo fuera de su distribución geográfica original y por lo tanto la baja diversidad encontrada puede además ser una consecuencia del bajo número de plantas noduladas capaces de colonizar el nuevo hábitat.

En la presente tesis se planteó i) identificar la extensión del polimorfismo genético de las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae mediante marcadores enzimáticos multilocus, el cual permite encontrar diferencias entre cepas estrechamente relacionadas, ii) obtener la secuencia parcial del rDNA 16S con el propósito de establecer la identidad genética de algunas cepas utilizadas en este estudio y compararla con las secuencias de otras cepas previamente descritas en el GeneBank. Este análisis permite la asignación de estas nuevas cepas al clado Rhamnaceae/Elaeagnaceae y iii) montar un ensayo de inoculación cruzada para establecer el grupo de infectividad de las cepas de *Frankia* derivadas de las especies vegetales nativas de la familia Rhamnaceae. Para ello se proponen las siguientes hipótesis:

Hipótesis y Objetivos

1.- Diversidad genética de *Frankia*

Cepas de *Frankia* filogenéticamente relacionadas, como aquellas aisladas de la familia Rhamnaceae y perteneciente al clado Elaeagnaceae/Rhamnaceae pueden ser identificadas mediante marcadores enzimáticos multilocus.

2.- Especificidad de huésped

Las cepas de *Frankia* aisladas de especies vegetales de la familia Rhamnaceae son capaces de infectar tanto a huéspedes de las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae. Por lo tanto, estas cepas forman parte del HSG3 que incluyen las cepas de *Frankia* aisladas de plantas de ambas familias.

Objetivo General

El objetivo general de la tesis es identificar el grupo de infectividad de las cepas que infectan rhamnáceas y determinar el grado de diversidad genética del grupo.

Objetivos Específicos

1.- Identificación de patrones multienzimáticos mediante la utilización de los siguientes sistemas: Esterasas (EST), Fosfoglucomutasa (PGM), Fosfoglucoisomerasa (PGI), Isocitrato-deshidrogenasa (IDH), Malato-deshidrogenasa (MDH), Fosfogluconato-deshidrogenasa (PGD), Diaforasa (DIA) y Menadiona reductasa (MNR).

2.- Determinación de la secuencia parcial del 16S rDNA de algunas cepas de *Frankia* de la familia Rhamnaceae.

3.- Comparación de los dendrogramas obtenidos a partir de marcadores enzimáticos multilocus y secuencia de 16S rDNA.

4.- Determinación de la infectividad de las cepas mediante ensayos de inoculación cruzada entre las cepas de *Frankia* y plantas actinorrhizas de la familia Rhamnaceae (*Trevoa trinervis*) y Elaeagnaceae (*Elaeagnus angustifolia*).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Cepas de *Frankia* estudiadas

Las cepas de *Frankia* utilizadas en este estudio, se indican en la Tabla 2. Se incluyen cepas aisladas de otras familias de plantas actinorrícicas para comparar la diversidad intra e interfamilia. Las cepas BR (ORS 020608), Allo2, G82, Eu1b y Ar13 fueron gentilmente proporcionadas por Dr. J. Schwencke (CNRS-Francia).

2.1.2. Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck: acrilamida, glicerol, piruvato, D(+)-glucosa monohidrato, fosfato de potasio monobásico y dibásico. De Sigma se obtuvieron glicina y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y los reactivos utilizados para las tinciones: NADH, DL-ácido cítrico, Menadiona, Fast Blue BB Salt (4-benzoilamino-2,5-dietoxibenzo diazonio cloruro), PMS (N-Metildibenzopirazina metil sulfato), 1% α -naftil acetato, Fast garnet GBC Salt (2-metil-4-[(2-metilfenil)-azo] benzodiazonio, NADP, NAD, D-fructosa-6-fosfato, α -D-glucosa 1-fosfato, β -naftil acetato, DL-ácido málico, α -D-glucosa 1,6 difosfato, DPIP (2,6-diclorofenolindofenol). El reactivo de Bradford y TRIS se obtuvieron de Bio-Rad y p-nitroblue tetrazolium de Calbiochem.

Tabla 2. Planta huésped y localidad de las cepas de *Frankia* utilizadas en este estudio.

Cepa	Planta Huésped	Localidad	Referencia
Familia Rhamnaceae			
ChI1, ChI2	<i>Colletia hystrix</i>	Caleu, Chile	Carú, 1993
ChI7	<i>Colletia hystrix</i>	Caleu, Chile	En este estudio
ChI3, ChI4, ChI5	<i>Colletia hystrix</i>	El Romeral, Chile	Carú, 1993
DiI1, DiI2	<i>Discaria trinervis</i>	Bariloche, Argentina	En este estudio
DsI12	<i>Discaria serratifolia</i>	Concepción, Chile	En este estudio
TiI42	<i>Trevoa trinervis</i>	Caleu, Chile	Carú, 1993
TiI11	<i>Trevoa trinervis</i>	Cajón del Maipo, Chile	Carrasco <i>et al.</i> , 1992
ReI6	<i>Retanilla ephedra</i>	Cuesta La Dormida, Chile	Carú, 1993
ReI7	<i>Retanilla ephedra</i>	Cuesta La Dormida, Chile	En este estudio
TqI15	<i>Talguenea quinquinervis</i>	Rio Clarillo, Chile	Carú, 1993
TqI20	<i>Talguenea quinquinervis</i>	Rio Clarillo, Chile	En este estudio
Familia Betulaceae			
AacI, AacII, AacIII	<i>Alnus acuminata</i>	Tucumán, Argentina	Carú, 2000
ArI3	<i>Alnus rubra</i>	Oregon, USA	Berry & Torrey 1979
Familia Casuarinaceae			
BR	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Brazil	Müller <i>et al.</i> , 1991
Thr	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	Egipto	Girgis <i>et al.</i> , 1990
Allo2	<i>Allocasuarina verticillata</i>	Uruguay	Girgis & Schwencke 1993
G82	<i>Gymnostoma</i>	USA	Savouré & Lim 1991
Familia Elaeagnaceae			
Eulb	<i>Elaeagnus umbellata</i>	Illinois, USA	

2.2. Métodos

2.2.1. Condiciones de cultivo

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

Cepas derivadas de otras familias actinorrícicas utilizan diferentes fuentes de carbono como sigue: cepas BR, AacIII, Allo2, Eu1b, G82, Thr piruvato 10mM; cepas AacII, AacI propionato 5mM; cepa G82 casaminoácidos 0.5 g/l.

El medio de cultivo BAP es una modificación del medio descrito por Murry *et al.* (1984) y contiene (g/l): glucosa 10; MgSO₄.7H₂O 0.05; CaCl₂.2H₂O 0.01; FeNaEDTA 0.01; NH₄Cl 0.267; 1ml de una solución stock de micronutrientes ((g/l): H₃BO₄ 2.86; MnCl₂.4H₂O 1.81; ZnSO₄.7H₂O 0.22; CuSO₄.5H₂O 0.08; Na₂MoO₄.2H₂O 0.025; CoSO₄.7H₂O 0.001); 1ml de una solución stock de vitaminas (mg/100ml): tiamina 10; pirodoxina 50; ácido nicotínico 50; biotina 22.5; ácido fólico 10; riboflavina 10. Luego de esterilizar se le agregó 10 ml de tampón fosfato estéril (10mM). El tampón fosfato se preparó titulando 1M K₂HPO₄ con 1M KH₂PO₄ hasta obtener un pH 6.8.

2.2.2. Preparación de extracto crudo

Las bacterias se cultivaron en botellas de 100ml a 28°C en medio BAP con los suplementos según la cepa durante 20 días sin agitación. El micelio se obtuvo por centrifugación (5000 x g, 15 min.), se lavó y se resuspendió en un tampón de extracción

Tris-HCl (0.16M pH6.8) y se mantuvo en hielo. Las células se sonicaron durante 5 x 15 seg. a 45 W usando un W185 Sonifier Cell Disruptor (Heat Systems Ultrasonic, Inc. Planview) en frío. Las muestras se centrifugaron a 5000 x g por 10 min., el sobrenadante se colectó y se mantuvo a -20°C en glicerol al 10% por un máximo de 7 días.

2.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Las muestras se separaron por electroforesis discontinua no-denaturante en geles de acrilamida - bisacrilamida (30:0.8). El gel separador se preparó al 10% (pH 8.8) y gel concentrador al 5% (pH 6.8). El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3) (Gardes *et al.*, 1987). 40µl de extracto crudo en glicerol 10% se cargaron en cada pocillo del gel. El gel se corrió a 24mV a 4°C por 3-4 horas o hasta que el colorante marcador (azul de bromofenol) alcanzó el final del gel.

Una vez terminada la electroforesis se realizaron tinciones específicas para cada sistema enzimático. Las reacciones histoquímicas se prepararon según Murphy *et al.*, (1996). El gel se incubó a 28°C por 2-3 horas o hasta que aparecieran bandas. Después de tener un registro de las bandas, los geles se secaron para conservarlos. Se ensayaron 19 sistemas enzimáticos, la preparación de las mezclas de reacción para cada sistema enzimático se describen a continuación

SISTEMA ENZIMATICO Y TAMPON DE REACCION	REACTIVOS	CANTIDAD DE REACTIVOS PARA UN VOLUMEN FINAL DE 75 ml
Diaforasa (DIA, E.C.1.6.4.3) Tampón Tris-HCl 0.2M pH7.0	2,6-dicloroindofenol ^a NADH NBT ^a	1ml 25mg 1ml
Menadiona reductasa (MNR, EC. 1.6.99) Tampón Tris-HCl 0.05M pH7.0	NADH Menadiona NBT	25mg 20mg 1ml
Malato-deshidrogenasa (MDH, E.C. 1.1.1.37) Tampón Tris-HCl 0.05M pH8.0	DL-Acido málico ^a NAD ^a NBT PMS ^a	5ml 1ml 1ml 0.5ml
Esterasas (EST, E.C. 3.1.1.1) α -esterasa β -esterasa Tampón Tris HCl 0.2M pH7.0	Fast Blue BB Salt 1% α -naftil acetato ^a Fast Garnet GBC Salt 1% β -naftil acetato ^a	60mg 1ml 100mg 1ml

Isocitrato-deshidrogenasa (IDH, E.C. 1.1.1.42) Tampón Tris-HCl 0.05M pH8.0	DL-ácido isocítrico NADP ^a 0.25M MgCl ₂ NBT PMS	60mg 1ml 1ml 1ml 0.5ml
Fosfoglucoisomerasa (PGI, E.C. 5.3.1.9) Tampón Tris-HCl 0.05M pH8.0	D-fructosa-6-fosfato 1% MgCl ₂ NADP NBT PMS G6PDH	25mg 1ml 1ml 1ml 0.5ml 20units
Fosfoglucomutasa (PGM, E.C. 2.7.5.1) Tampón Tris-HCl 0.05ml pH8.0	α-D-glucosa 1,6-difosfato α-D-glucosa 1-fosfato 1% MgCl ₂ NADP NBT PMS G6PDH	1ml ^a 140mg 1ml 1ml 1ml 0.5ml 20units
Alcohol deshidrogenasa (ADH, E.C. 1.1.1.1) Tampón Tris-Hcl 0.05M pH8.5	Etanol NAD NBT PMS	2ml 40mg 10mg 1mg

Glicerol deshidrogenasa (GLYD, E.C. 1.1.1.72) Tampón Tris-HCl 0.1M pH8.4	Glicerol NADP NBT PMS	5ml 8mg 10mg 2mg
Leucina deshidrogenasa (LEUDH, E.C. 1.4.1.9) Tampón Tris-HCl 0.1M pH7.0	L-leucina NAD NBT PMS	50mg 50mg 30mg 2mg
Alanina deshidrogenasa (ALADH E.C. 1.4.1.1) Tampón Tris-HCl 0.1M pH7.0	D,L-alanina NAD NBT PMS	100mg 50mg 30mg 2mg
Histidinol deshidrogenasa (HISDH E.C. 1.1.1.23) Tampón Tris-HCl 0.1M pH8.0	L-histidinol NAD NBT PMS	40mg 20mg 10mg 1mg

^a Ver apéndice

2.2.4. Análisis del polimorfismo enzimático multilocus

La identificación de las cepas fue a través de una comparación visual en donde se determinó la presencia y/o ausencia de bandas y no la intensidad de la tinción. Para propósitos del análisis se consideraron solo aquellas bandas que eran reproducibles después de varios ensayos. En algunas cepas no se detectó actividad enzimática ni siquiera después de tres ensayos independientes. En estos casos la ausencia de actividad se registró como no detectado (nd) y para el análisis se consideró como alelo nulo.

Para cada cepa estudiada se registró el patrón de bandas para los distintos sistemas enzimáticos ensayados. Cada electromorfo se designó por un número, 1, 2, 3 etc de acuerdo a su posición en el gel, siendo 1 el de menor migración. La combinación de electromorfos se consideró como fenotipo electroforético de la cepa.

La diversidad de electromorfos (H) se calculó para cada enzima según la fórmula $H=1-\sum x_i^2$ donde x_i es la frecuencia del i esimo electromorfo (Gardes *et al.*, 1987). Los coeficientes de similitud de Jaccard se calcularon mediante la razón entre el número de fenotipos electroforéticos compartidos y el número total de sistemas enzimáticos comparados. Con estos datos se construyó una matriz de similitud que fue sometida a un análisis de cluster usando el programa UPGMA del PHYLIP (Felsenstein, 1993). Este método de "cluster" comienza agrupando los dos OTUs (unidades taxonómicas operacionales) con menor distancia formando un grupo compuesto el cual es luego comparado con el resto de los OTUs. En cada paso se agrupan los dos OTUs más cercanos y el análisis finaliza cuando los dos últimos

OTU son agrupados. Este método supone una tasa evolutiva constante en los distintos linajes lo cual no siempre se cumple. Los datos también fueron sometidos a un análisis de Neighbor-Joining (PHYLIP) el cual es método alternativo de agrupamiento que corrige la suposición de una tasa evolutiva constante (Felsenstein, 1993).

3. Secuenciación y análisis del rDNA 16S

Para la identificación filogenética de algunas cepas del estudio se secuenció un fragmento del 16S rDNA de *Frankia* correspondiente a 378 pb que según estudios previos contiene el 45% de los sitios variables (Clawson *et al.*, 1998). La secuenciación de los fragmentos de rDNA se realizó en el laboratorio del Dr. D. Benson (University of Connecticut) según el método descrito por Benson *et al.*, (1996). En breve, el DNA genómico de *Frankia* se aisló a partir de micelio lavado y resuspendido en 0.1ml de TE. Se agregó 0.1ml de 0.2N NaOH-1% sodium dodecyl sulfate (SDS) y se agitó. Las muestras se colocaron en un baño de agua por 7 minutos, se enfriaron en hielo y centrifugaron (12,500 rpm, 5 min). Luego, se agregó 0.33 volumen de 7.5M acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol frío. El precipitado se colectó por centrifugación (12,500 rpm, 10 min), el pellet se lavó dos veces con etanol 70% se secó y resuspendió en 50ul de TE. La mezcla de reacción para la amplificación de rDNA 16S por PCR consistió en DNA cromosómico como templado; 0.2uM partidor fD1; 0.2uM partidor rDB1; 200uM de cada dNTP; 2.5mM MgCl₂; 3.75U de AmpliTaq DNA polimerasa 100uM albúmina bovina estéril; 10mM Tris-HCl (pH 8.3); y 50mM KCl.

El PCR se realizó en un termociclador Perkin-Elmer modelo 2400, bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 2min, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, annealing a 57°C por 30 s, y extensión a 72°C por 1min. La extensión final fue a 72°C por 7min. Los fragmento de 378 pb del 16S rDNA de las cepas de *Frankia* fueron amplificados utilizando los partidores bacterianos universales fD1 (partidor directo 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Weisburg *et al.*, 1991), y rDB1 (partidor reverso 5'-CCAAGCTTGAGGTTTACAACCCGAA-3') diseñado para evitar la amplificación de DNA de organelos (Benson *et al.*, 1996). Ambos partidores están diseñados para generar 16S rDNA de mayoría de las bacterias. Los partidores fD1 y rDB1 flanquean las posiciones 28 a 419 en el 16S rRNA de *Escherichia coli* y en *Frankia*, corresponde a una región próxima al terminal 5' (Clawson *et al.*, 1998).

Las secuencias del rDNA 16S se alinearon por el método de ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/ClustalW>). El árbol filogenético se construyó por el método de Neighbor-Joining utilizando el coeficiente de Kimura (K2P) con un análisis de bootstrap de 500 réplicas en el programa TREECON para Windows (Van de Peer & De Wachter, 1993). El método de agrupamiento por Neighbor-Joining estima la distancia de cada OTU al nodo que los une y agrupa a los de menor distancia para luego construir una nueva matriz de distancia que se somete al análisis y así sucesivamente.

En este estudio se incluyeron las siguientes cepas aisladas de la familia Rhamnaceae: ChI1, ChI4, ReI7, TtI42, TqI20 y DtI1, además de 2 cepas aisladas de la

familia Betulaceae, AacI y AacII. Para el análisis filogenético se compararon las secuencias en estudio con secuencias previamente publicadas de otras cepas de *Frankia*.

4. Determinación de infectividad de las cepas de *Frankia* (ensayo de inoculación)

4.1. Preparación del inóculo

Las cepas de *Frankia* se mantuvieron en medio BAP-glucosa sin nitrógeno mediante traspaso cada 5 días de una suspensión de micelio homogenizado. Las células fueron colectadas por centrifugación (5000 x g, 15 min), lavadas y resuspendidas en una solución de Hoagland 1/4 sin nitrógeno pH5.5 (Hoagland & Arnon, 1950) (Apéndice) a una concentración micelial equivalente a 3µg/ml de proteínas totales. La concentración de la muestra se determinó por el ensayo de Bradford (BioRad).

4.2. Producción de plantas y ensayo de infectividad

Semillas de *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) y *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae) se germinaron en arena estéril, previa aplicación de tratamientos pregerminativos, las semillas se trataron con H₂SO₄ concentrado del tipo comercial, por 20 min, y luego se lavaron en agua por 24 horas. A continuación se hizo una estratificación fría durante 30 días a 5°C (húmeda/fría). Una vez que las plántulas alcanzaron una altura de 4-5cm se transfirieron a una mezcla de turba-vermiculita (1:1) en bandejas de poliestireno expandido (speedlings) y regadas una vez por semana con 1ml solución Hoagland ¼. Tres semanas previas a la inoculación, se les administro

Hoagland $\frac{1}{4}$ sin nitrógeno. Luego, las plantas se inocularon con 5 ml de la suspensión micelial homogenizada preparada a 3ug/ml de proteínas totales (Selim & Schwencke, 1995).

La infectividad de cada cepa aislada de rhamnáceas se determinó sobre 20 plantas en una especie de Rhamnaceae (*Trevoa trinervis*) y una especie de Elaeagnaceae (*Elaeagnus angustifolia*). Como un control positivo de los ensayos de inoculación se utilizó la pareja Eu1b sobre *Elaeagnus angustifolia* y TtI42 sobre *Trevoa trinervis*. Tanto las plantas inoculadas y las plantas controles se crecieron en invernaderos en condiciones idénticas. Las plantas se mantuvieron en el vivero durante 8 meses y luego se evaluó la infectividad y efectividad.

4.3. Infectividad y efectividad

En los ensayos de infectividad se analizaron los siguientes parámetros simbióticos: capacidad de nodulación (% de plantas noduladas) y la fijación de nitrógeno (actividad de nitrogenasa).

4.4. Actividad de nitrogenasa

La actividad nitrogenasa de los nódulos se determinó por el ensayo de reducción de acetileno a etileno según el método de Postgate (1972). Los nódulos fueron escindidos del sistema radicular e inmediatamente expuestos a una mezcla de acetileno-aire al 10% v/v, en viales sellados e incubados a 28°C durante 12 horas. La producción de etileno se midió en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-8^a

equipado con un detector FID (Flame Ionization Detector) y una columna de acero inoxidable (1.0m x 3mm) empacada con Porapak N (divinilbenzeno/vinyl pyrrolidona). La temperatura de la columna fue 50°C, la temperatura del inyector y del detector fue 100°C. El flujo de N₂ (gas carrier) fue 2ml/min. La actividad nitrogenasa *in planta* se registró como nmol de C₂H₄ producido por hora por miligramo de peso seco de nódulos por planta (ARA).

3. RESULTADOS

3.1. Polimorfismo Enzimático Multilocus

3.1.1. Sistemas Enzimáticos

Para el estudio del polimorfismo enzimático multilocus se ensayaron 19 sistemas enzimáticos, sin embargo la mayoría de las cepas mostraron actividad con 8 de estos sistemas los cuales se consideraron en el análisis final. Los sistemas enzimáticos con detección positiva fueron los siguientes: DIA, MNR, MDH, α -EST, β -EST, IDH, PGI y PGM (Tabla 3).

En la Tabla 3 se registran los fenotipos electroforéticos y el número de electromorfos de todas las cepas utilizadas con cada sistema enzimático ensayado. Los números fueron asignados para cada banda según la dirección de corrida del gel de ánodo a cátodo para indicar los distintos electromorfos observados. Los sistemas con mayor número de electromorfos fueron DIA, MNR y β -EST, mientras PGI y PGM presentaron el menor número de electromorfos. Combinaciones de estos electromorfos permitieron identificar un fenotipo enzimático para cada cepa (Tabla 3). Los resultados obtenidos con las tinciones específicas para cada sistema enzimático se detallan a continuación. Las fotos (Fig. 1-8) muestran algunos fenotipos obtenidos para algunas de las cepas del estudio luego de cada tinción específica y solo representan un ejemplo de cada marcador utilizado.

Tabla 3. Fenotipos Electroforéticos de las cepas de *Frankia*

Cepas	DIA	MNR	MDH	α -EST	β -EST	IDH	PGI	PGM
Rhamnaceae								
ChI1	2,9	2,8	4	4	5	2,6	3	5
ChI2	2,9	2,8	4	4	5	2,6	3	5
ChI3	2,9	3,8	4	4	5	1,6	3	5
ChI4	2,9	2,8	4	4	5	6	3	3
ChI5	2,9	2,8	nd	4	5	1,6	nd	4
ChI7	2,9	2,8	4	4	5	6	3	4
DtI1	nd	2,8	4	4	5	6	3	3
DtI2	2,7	2,6	4	4	5	6	4	3
DsI12	8	3,6	4	nd	5	nd	3	4
TtI42	2,9	2,8	5	4	5	1,6	3	4
TtI11	2,9	2,8	3	4	5	1,6	3	4
ReI6	2,9	2,8	4	4	5	6	2	4
ReI7	2,9	2,8	4	4	5	6	2	4
TqI15	2,9	3,8	4	3,5,6	6	2,6	3	4
TqI20	2,9	2,8	4	4	5	6	3	5
Betulaceae								
AacI	6,7	5,6	4	4,5	2,5	2,4,5	1,4	nd
AacII	4,5	4	4	2,3	3,4	2,5	1,4	nd
AacIII	4,5	4	4	2,3	3,4	2,5	4,5	nd
ArI3	2,9	2,7	4	4	5	2,6	3	5
Casuarinaceae								
BR	4,5	1,4	1,5	1	1,7	2,3	3	1,2
Allo2	4,5	4	1,5	1	1,5	2,3	3	1,2
Thr	1	4	1,5	1	1	2,3	nd	1,2
G82	2,5	1,6	6	5	6	1,2	nd	4
Elaeagnaceae								
Eu1b	3	1,3,8	2	5	1,6	nd	3	5
No. Electromorfos	9	8	6	6	7	6	5	5
No. Fenotipos	8	10	6	6	8	7	5	4
Diversidad Fenotípica	0.639	0.743	0.491	0.594	0.587	0.801	0.467	0.694

nd = no detectado

DIA (Fig. 1. Tabla 3) - Todas las cepas pertenecientes al grupo de Rhamnaceae exhibían dos electromorfos con las excepciones de DsI12 identificada por un solo electromorfo y la cepa DtI1 que no mostró actividad. Las cepas DtI2 y DsI12 exhibieron patrones distintos tanto con el resto del grupo como entre ellas. La cepa ArI3 (Betulaceae) exhibió el mismo patrón de electromorfos que las cepas de Rhamnaceae. Dentro de las cepas aisladas de Betulaceae, dos de ellas AacII y AacIII compartieron los electromorfos 4 y 5. Dos cepas aisladas de la familia Casuarinaceae, BR y Allo2 también presentan los mismos electromorfos 4 y 5, y mostraron diferencias con Thr y G82, también pertenecientes a la familia Casuarinaceae que presentan un fenotipo distinto. La cepa Eu1b se discriminó fácilmente ya que el electromorfo 3 fue único entre las cepas. En este sistema enzimático se observaron 9 electromorfos distintos, el valor más alto de los 8 sistemas ensayados.

MNR (Fig. 2, Tabla 3) - La mayoría de las cepas pertenecientes al grupo de Rhamnaceae mostraron los mismos electromorfos, sin embargo las cepas DsI12 (*Discaria*), ChI3 (*Colletia*) y TqI15 (*Talguenea*) exhiben un patrón de banda distinto en el grupo. Estas tres cepas comparten el electromorfo 3, mientras las cepas DtI2 y DsI12 ambas derivadas del género *Discaria* comparten el electromorfo 6. Los resultados indican que dentro de la familia Rhamnaceae hay un alto grado de homogeneidad. Las cepas de la familia Casuarinaceae (Allo2 y Thr) presentan el mismo electromorfo, mientras BR y G82 exhiben dos fenotipos distintos pero compartiendo el electromorfo 1. La cepa Eu1b se diferencia claramente del resto de las cepas estudiadas, presentando

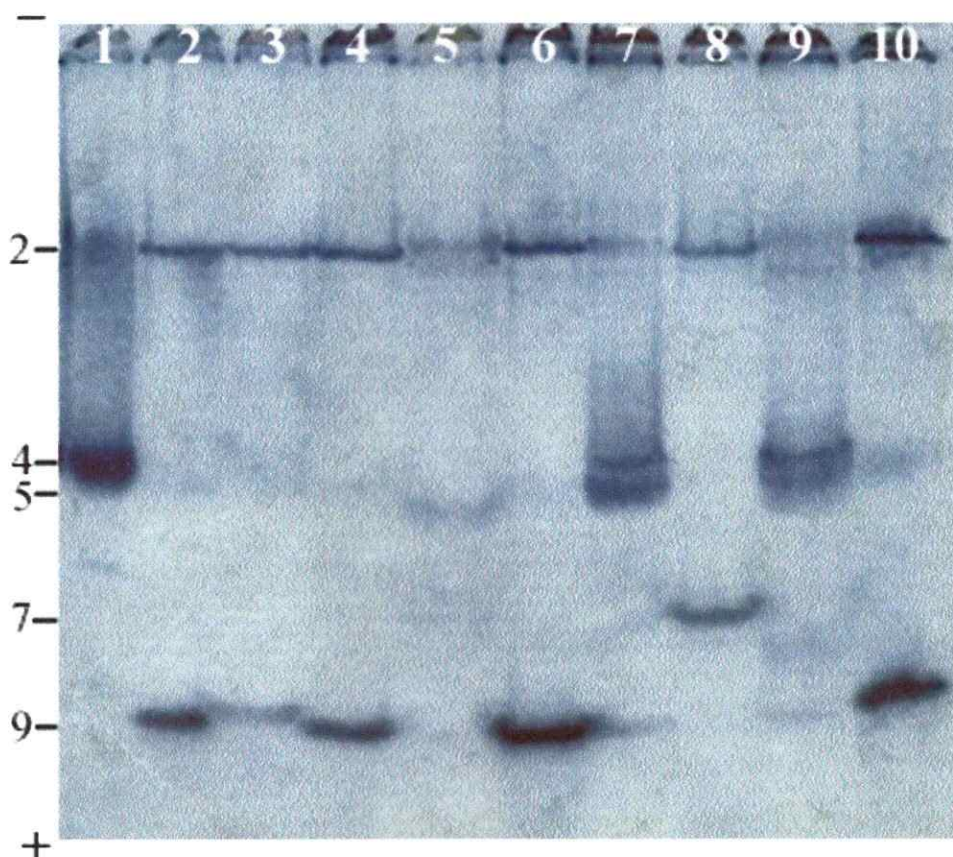


Figura 1: Patrones electroforéticos de diaforasa (DIA) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40 μ l de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3). Carril 1) BR, 2) ChI5, 3) TqI15, 4) ChI3, 5) DtI1, 6) TtI11, 7) AacII, 8) DtI2, 9) AacIII y 10) TqI20. Electromorfos identificados 1-8.

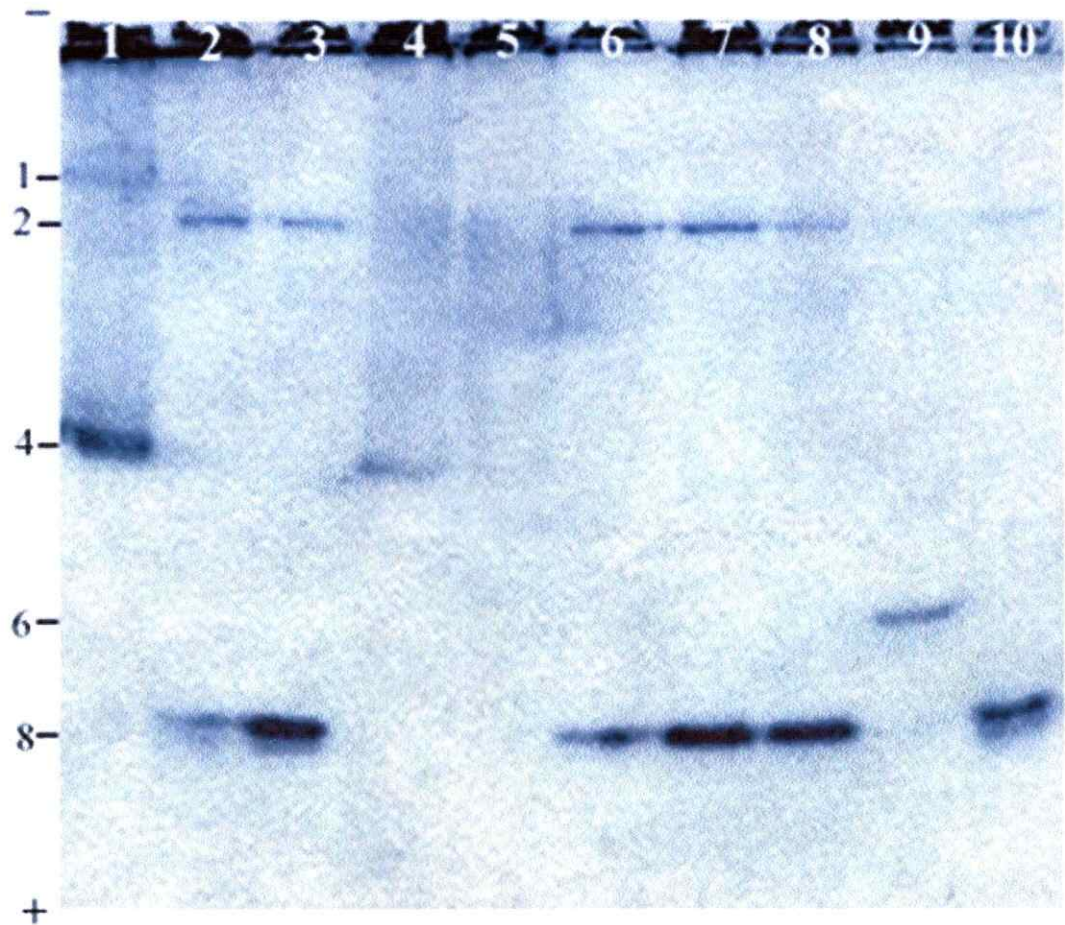


Figura 2: Patrones electroforéticos de menadiona reductasa (MNR) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40µl de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) BR, 2) Rel7, 3) Ttl42, 4) Allo2, 5) control negativo, 6) ChI7, 7) ChI5, 8) TqI20, 9) DtI2 y 10) Rel6. Electromorfos identificados 1-9.

un fenotipo diferente y siendo la única cepa dentro de este sistema identificada por tres electromorfos 1,3,8.

MDH (Fig. 3, Tabla 3) - El grupo compuesto por las cepas aisladas de la familia Betulaceae (AacI, AacII, AacIII y ArI3) también compartió el mismo electromorfo que las cepas de la familia Rhamnaceae. Las cepas de Rhamnaceae mostraron gran homogeneidad en el patrón de actividad MDH, excepto la cepa ChI5 que no expresó actividad y las dos cepas aisladas de *Trevoa trinervis* TtI42 y TtI11 que tenían electromorfos distintos al resto del grupo de cepas. El grupo de cepas de Casuarinaceae comparten el mismo patrón enzimático, excepto G82 cuyo electromorfo era único dentro de todas las cepas. La cepa Eulb (Elaeagnaceae) también exhibe un electromorfo que la distingue del resto de las cepas estudiadas. La diversidad fenotípica de este enzima fue baja con un valor similar a PGI, siendo estos valores los más bajos de todos los sistemas enzimáticos ensayados (Tabla 3).

α -EST (Fig. 4, Tabla 3) - A excepción de dos cepas, el grupo de la familia Rhamnaceae mostró, como en los sistemas anteriores, un mismo electromorfo indicando la existencia de una alta homogeneidad entre las cepas. Las excepciones fueron las cepas DsI12 a la cual no se le detectó actividad, y TqI15 que era discriminada fácilmente del resto del grupo por tener un patrón de tres electromorfos (3,5,6) comparada con el electromorfo 4 observado en el resto del grupo de las rhamnáceas. Esta característica puede servir para su identificación dentro del grupo. Las cepas

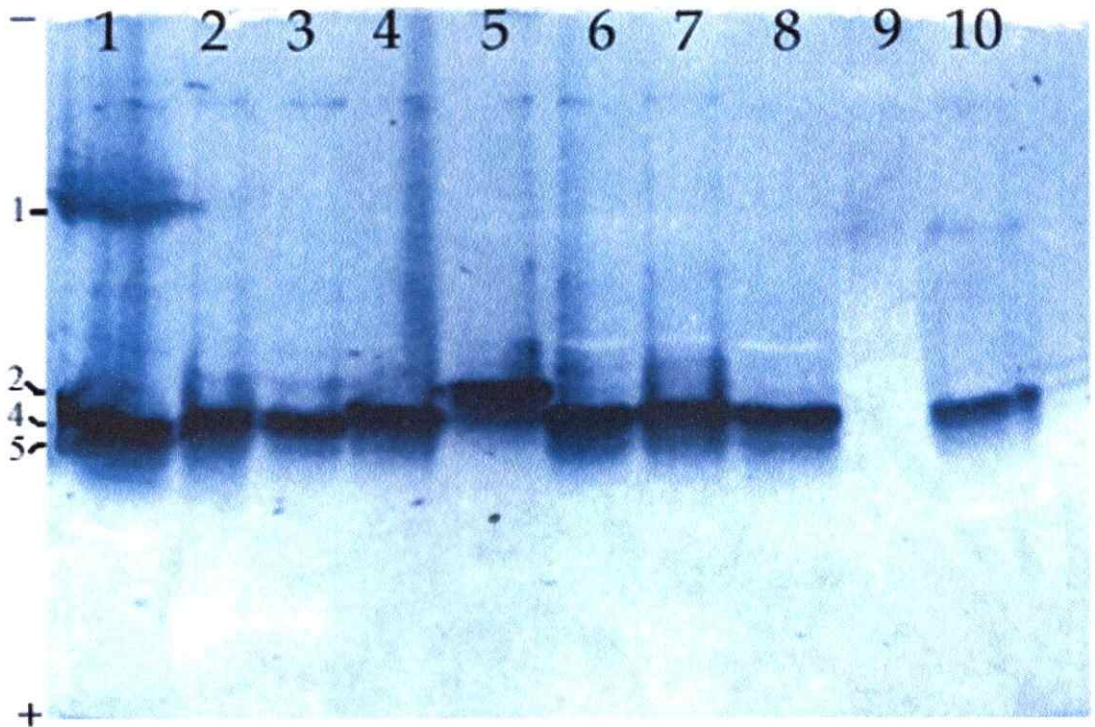


Figura 3: Patrones electroforéticos de malato deshidrogenasa (MDH) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40 μ l de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) BR, 2) AacIII, 3) AacI, 4) DsI12, 5) Eu1b, 6) TqI20, 7) ChI4, 8) ChI7, 9) ChI5 y 10) ArI3. Electromorfos identificados 1-5.

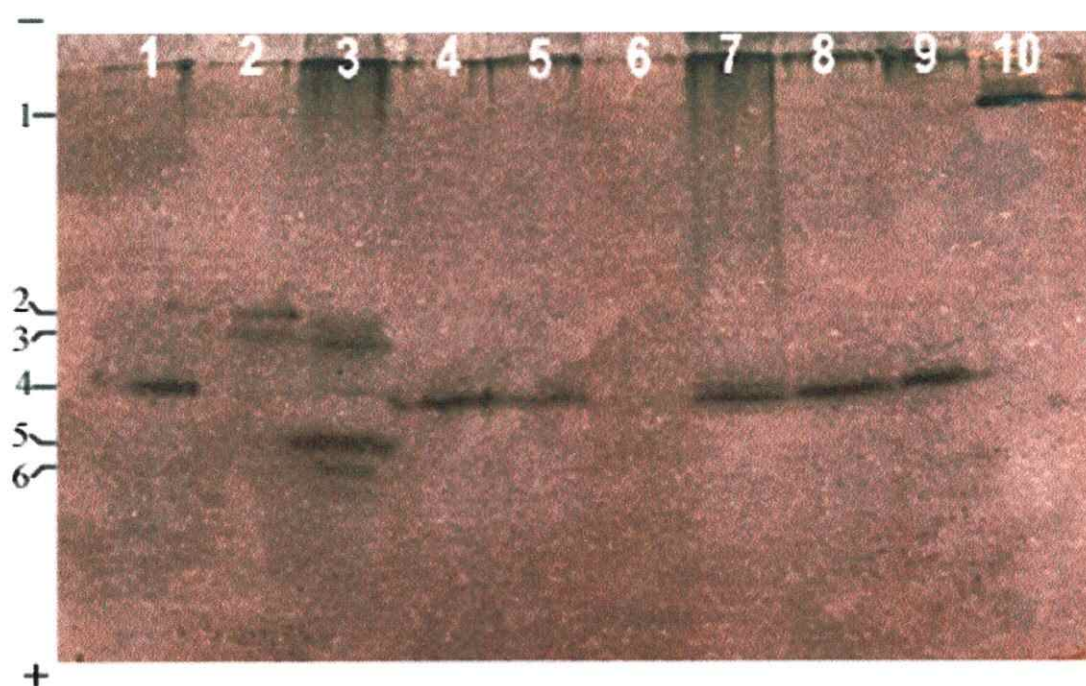


Figura 4: Patrones electroforéticos de alpha-esterasa (α -EST) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40 μ l de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) ArI3, 2) AacII, 3) TqI15, 4) ReI6, 5) TtI42, 6) DsI12, 7) DtI1, 8) ChI1, 9) ChI3 y 10) BR. Electromorfos identificados 1-6.

derivadas de la familia Betulaceae tienen patrones electroforéticos distintos entre ellas, excepto AacII y AacIII que exhiben el mismo fenotipo enzimático de dos bandas. Asimismo, la cepa ArI3 comparte el electromorfo 4 con las cepas derivadas de Rhamnaceae. Las cepas de *Frankia* del grupo Casuarinaceae mostraron homogeneidad, excepto por la cepa G82 que tanto en este como en los otros sistemas enzimáticos aparece con un patrón de electromorfos distinto. Sin embargo para este sistema, G82 y Eu1b (Elaeagnaceae) tienen el mismo electromorfo (5).

β -EST (Fig. 5, Tabla 3) - Todas las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae demostraron ser un grupo muy homogéneo, exceptuando la cepa TqI15. Curiosamente, las cepas G82 (Casuarinaceae) y TqI15 (Rhamnaceae) comparten el mismo electromorfo, mientras ArI3 (Betulaceae) exhibe el mismo electromorfo que el resto del grupo de las cepas de la familia Rhamnaceae. Las cepas de la familia Betulaceae muestran 3 fenotipos enzimáticos, las cepas AacII y AacIII comparten el mismo patrón para este enzima, mientras la cepa ArI3 como en muchos sistemas, tiene el electromorfo 6 el cual identifica a las cepas de la familia Rhamnaceae. Para este marcador enzimático las cepas de la familia Casuarinaceae presentan mayor heterogeneidad intrafamilia ya que cada una de ellas tiene un patrón de electromorfos distinto aunque las cepas BR, Allo2 y Thr comparten el electromorfo 1 entre ellas. Este marcador genético presentó un bajo valor de diversidad fenotípica (0.587).

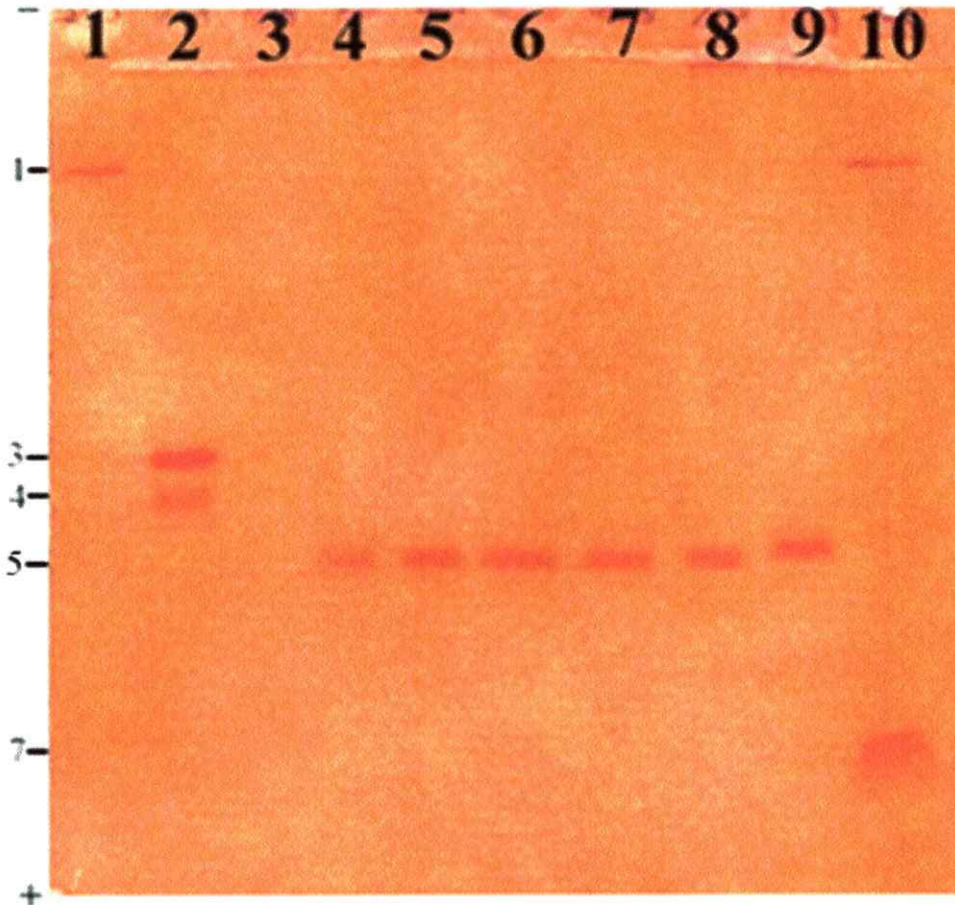


Figura 5: Patrones electroforéticos de beta-esterasa (β -EST) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40 μ l de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) Thr, 2) AacIII, 3) control negativo, 4) ChI7, 5) Rel6, 6) Rel7, 7) TqI20, 8) ArI3, 9) ChI3 y 10) BR. Electromorfos identificados 1-8.

IDH (Fig. 6, Tabla 3) - El grupo de las cepas pertenecientes a la familia Rhamnaceae presentaron tres fenotipos diferentes, mientras que para la cepa DsI12 no se le detectó actividad a pesar de múltiples intentos. Para este marcador, tenemos un polimorfismo intrafamiliar comparable con otros sistemas tal como PGI y PGM. Muchas de las cepas pertenecientes a la familia Rhamnaceae se identificaron con dos electromorfos, donde el electromorfo 6 era común para todas las cepas. Las cepas AacII y AacIII (Betulaceae) compartieron el mismo fenotipo mientras la cepa AacI presentó un electromorfo adicional. La cepa aislada de *Alnus rubra* (ArI3) presentó un fenotipo idéntico a TqI15 (Rhamnaceae), y es claramente distinta a las otras cepas aisladas de *Alnus* sp. Dentro de la familia Casuarinaceae G82 era fácilmente discriminada por su fenotipo, mientras BR, Allo2 y Thr presentan el mismo fenotipo (2,3). El valor obtenido de diversidad fenotípica es el más alto de los 8 sistemas (0.801).

PGI (Fig. 7, Tabla 3) - En el grupo de Rhamnaceae el marcador PGI es moderadamente variable, en él se pueden distinguir 3 fenotipos enzimáticos y un fenotipo "nulo" en el caso de ChI5. Sin embargo, el electromorfo más común (3) está presente en las otras familias dando cuenta de una baja heterogeneidad interfamilia. Las cepas aisladas de *Alnus acuminata* AacI, AacII y AacIII (Betulaceae) muestran un patrón de electromorfos distintos a las cepas derivadas de plantas de Rhamnaceae. Por el contrario, la cepa ArI3 presenta el electromorfo más común entre las cepas derivadas de Rhamnaceae (3). En el grupo de cepas aisladas desde Casuarinaceae, dos de ellas BR y Allo2 exhibieron el electromorfo 3 presente en Rhamnaceae, mientras Thr como

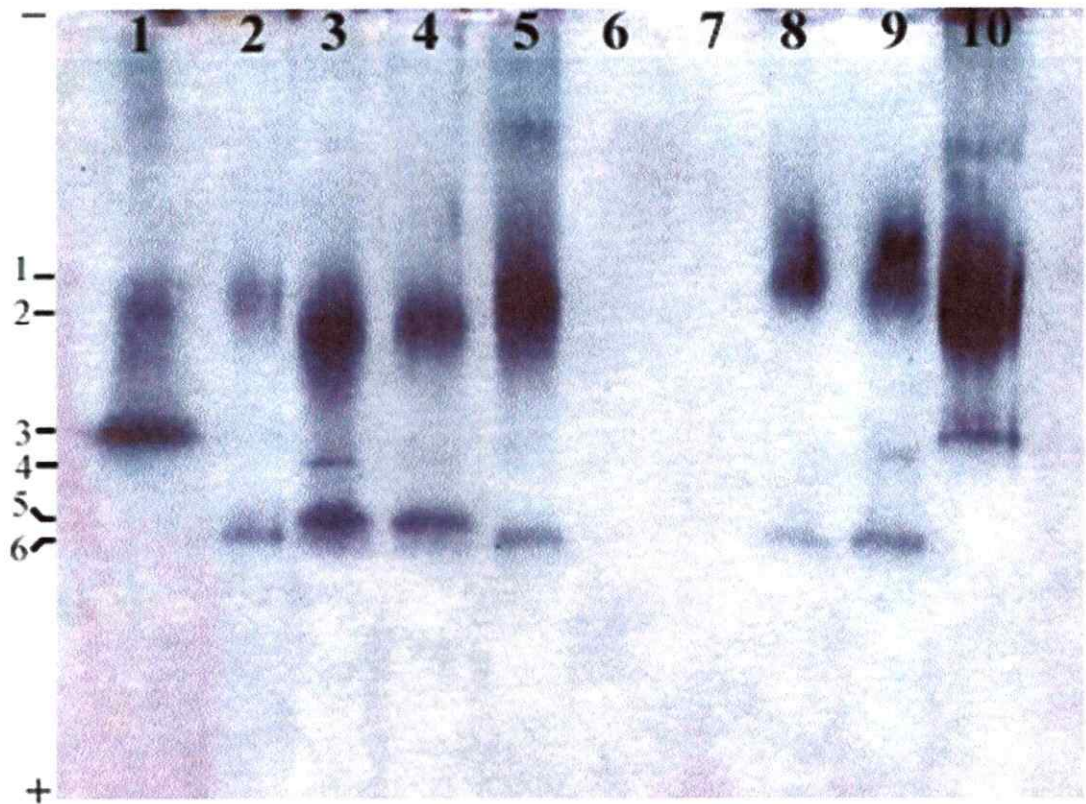


Figura 6: Patrones electroforéticos de isocitrato deshidrogenasa (IDH) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40µl de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) BR, 2) ChI1, 3) AacI, 4) AacIII, 5) ArI3, 6) EuIb, 7) DsI12, 8) TtI42, 9) AacI y 10) Thr. Electromorfos identificados 1-6.

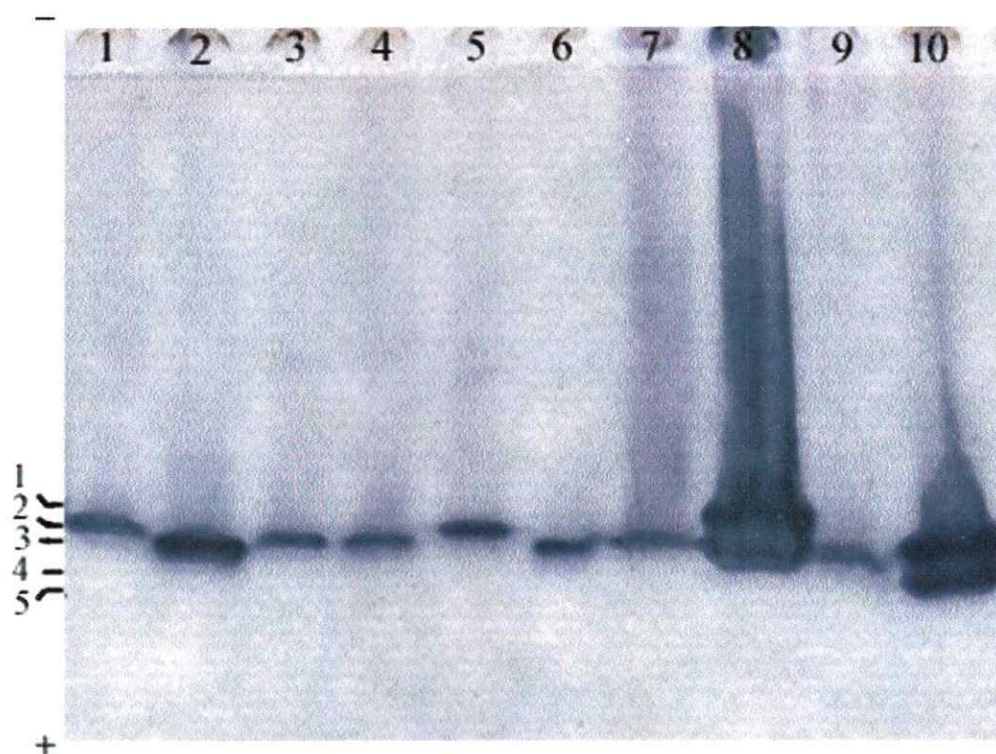


Figura 7: Patrones electroforéticos de fosfoglucoisomerasa (PGI) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40 μ l de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) Rel6, 2) ChI2, 3) Ttl11, 4) ChI1, 5) Rel7, 6) Dtl2, 7) ChI5 8) AacI, 9) Dtl2 y 10) AacIII. Electromorfos identificados 1-5.

G82 no mostraron actividad para este sistema ensayado. Se obtuvo un bajo nivel de diversidad fenotípica (0.467) para el marcador PGI.

PGM (Fig. 8, Tabla 3) - A diferencia del resto de los sistemas enzimáticos el marcador PGM presentó un gran polimorfismo entre las cepas derivadas de Rhamnaceae, identificándose 3 electromorfos dentro del grupo como se observó para IDH. Este sistema enzimático presenta uno de los mayores valores de diversidad fenotípica (0.694) junto con los sistemas MNR y IDH. Aunque el sistema PGI presenta también 3 electromorfos, aparece menos variable, ya que hay un electromorfo en alta frecuencia. Ninguna de las cepas aisladas de *Alnus acuminata* (AacI, AacII y AacIII) (Betulaceae) mostró actividad para este sistema excepto ArI3 derivada de *Alnus rubra*. Como en muchos de los otros sistemas enzimáticos, está claro que la cepa ArI3 difiere de las otras cepas del grupo Betulaceae, y en el dendrograma construido con estos datos, ésta cepa se ubica en el cluster formado por las cepas derivadas de Rhamnaceae (Fig. 9). En el caso de la familia Casuarinaceae, G82 comparte el electromorfo 4 con algunas cepas derivadas de la familia Rhamnaceae, mientras las otras cepas presentan el mismo fenotipo (1,2).

En gran parte, las cepas derivadas de la familia Rhamnaceae se identificaron con un patrón de un solo electromorfo. Sin embargo, cepas como TqI15 y DsI12 fueron fácilmente identificadas por la presencia de más bandas o una banda con migración diferente o en el caso de DsI12 por la ausencia de actividad (nd) en muchos de los sistemas ensayados. En algunos de los sistemas enzimáticos, si bien se detectan varios

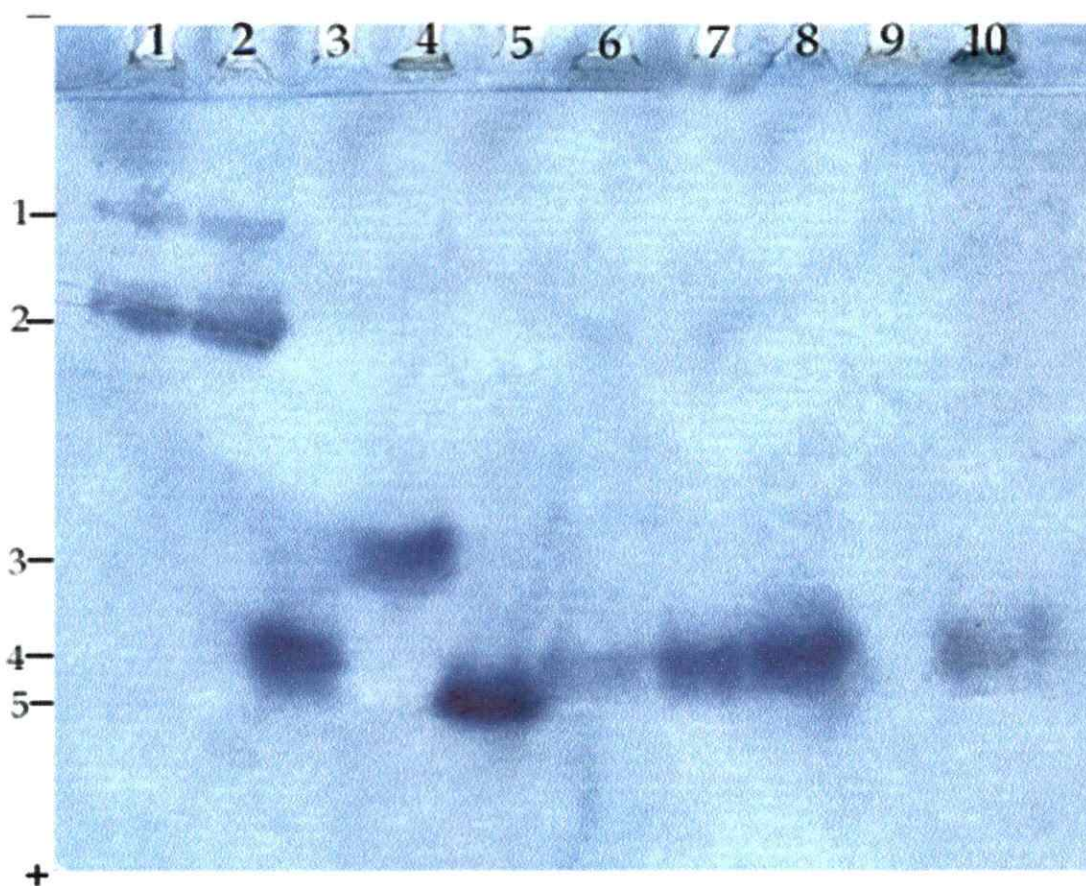


Figura 8: Patrones electroforéticos de fosfoglucomutasa (PGM) para algunas cepas de *Frankia*. Las muestras (40 μ l de extracto crudo) se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 10%. El tampón de corrida fue Tris-glicina (Tris 50mM/Glicina 0.38M pH8.3).

Carril 1) BR, 2) Thr, 3) ReI6, 4) DtI2, 5) EuIb, 6) TtI11, 7) ChI5, 8) TtI42, 9) AacIII y 10) ChI7. Electromorfos identificados 1-4.

electromorfos la diversidad fenotípica del marcador es baja ya que uno de los electromorfos aparece con alta frecuencia. Por el contrario, el marcador IDH presenta la mayor diversidad fenotípica (0.801) con la presencia de 6 electromorfos, los cuales se encuentran a frecuencias intermedias dentro de las 4 familias.

También se ensayaron otros sistemas enzimáticos los cuales no se consideraron en el análisis final ya que dieron una tinción positiva con sólo algunas cepas. Estos sistemas enzimáticos son los siguientes: alcohol deshidrogenasa (ADH), gliceraldehido deshidrogenasa (GLYD), leucina deshidrogenasa (LEUDH), alanina deshidrogenasa (ALADH) y histidina deshidrogenasa (HISDH). Las cepas que presentan estas actividades se indican en la Tabla 4. Estos marcadores enzimáticos permitieron identificar solamente cepas pertenecientes al grupo de la familia Casuarinaceae, BR, Thr y Allo2, con respecto al resto de las cepas de *Frankia* estudiadas. Dentro de la familia Rhamnaceae solo 3 cepas mostraron actividad para estos sistemas, ChI1, ChI2 y TqI15. Esta última mostró un fenotipo electroforético distinto en varios de los sistemas ensayados. Por otra parte quedó claramente establecido que las cepas ChI1 y ChI2 muestran un fenotipo idéntico.

3.1.2. Análisis del polimorfismo enzimático multilocus

Para establecer si los fenotipos electroforéticos permiten establecer diferencias entre cepas derivadas de plantas de una familia (intrafamilia) o entre familias (interfamilia), se determinó un coeficiente de similitud (Jaccard) entre todos los pares posibles. La similitud genética se define como la proporción de marcadores o bandas que son compartidas entre las dos cepas en comparación.

Tabla 4. Sistemas enzimáticos adicionales.

Cepas con actividad	Sistemas enzimáticos				
	ADH	GLYD	LEUDH	ALADH	HISDH
Rhamnaceae					
ChI1	-	-	-	-	+
ChI2	-	-	-	-	+
TqI15	-	-	+	+	-
Casuarinaceae					
BR	+	+	+	+	+
Thr	+	+	+	+	+
Allo2	-	+	-	+	+

Existen al menos tres índices de similitud para datos genéticos, el índice de Jaccard, Simple Matching y el índice de Nei y Li. El índice de similitud de Jaccard fue utilizado en este estudio de MLEE para cuantificar el grado de similitud intra e inter familia de las cepas de *Frankia*. Este es un índice más conservador y no sobrestima la similitud ya que consiste en comparar los fenotipos electroforéticos como un todo y no los electromorfos en forma individual, en este último caso la similitud podría estar dada más por la ausencia de bandas que por la presencia de éstas. Sin embargo, el índice de Nei y Li es bastante parecido al de Jaccard, particularmente a medida que los dos índices se aproximan a un valor de 1, es decir total similitud (<http://www.bioss.sari.ac.uk/tele/newtech/newmole.htm>).

Los coeficientes de similitud pueden ser convertidos a disimilitud antes de hacer el análisis de cluster. Por lo tanto, el coeficiente de Jaccard fue convertido a una medida de distancia por sustracción desde 1 (distancia = 1 – coeficiente Jaccard). A partir de estos datos se construyó una matriz de distancia (Tabla 5). La matriz obtenida se sometió a un análisis de UPGMA y el dendrograma resultante se muestra en la figura 9. Los datos también fueron sometidos al análisis de Neighbor-Joining observándose una topología similar a la obtenida por el método de UPGMA, es decir se confirmaban las mismas relaciones genéticas por ambos métodos.

La robustez de cada nodo en el dendrograma no ha sido determinada dado que no disponemos de un análisis para matrices de distancia triangular. Sin embargo la topología del dendrograma es coincidente con nodos del árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del rDNA 16S.

Tabla 5. Matriz de distancia.

	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch7	Dh1	Dh2	Ds12	Tt142	Tt11	Rel6	Rel7	Tq15	Tq120	Aacl	AaclII	AaclIII	Arl3	BR	Allo2	Thr	G82	Eu1b
Ch1	0																							
Ch2	0	0																						
Ch3	0.25	0.25	0																					
Ch4	0.25	0.25	0.38	0																				
Ch5	0.33	0.33	0.33	0.33	0																			
Ch7	0.25	0.25	0.38	0.13	0.17	0																		
Dh1	0.29	0.29	0.43	0	0.4	0.14	0																	
Dh2	0.63	0.63	0.63	0.38	0.67	0.5	0.2	0																
Ds12	0.5	0.5	0.5	0.5	0.33	0.4	0.67	0																
Tt142	0.38	0.38	0.38	0.38	0	0.25	0.43	0.75	0.5	0														
Tt11	0.38	0.38	0.38	0.38	0	0.25	0.43	0.75	0.5	0.13	0													
Rel6	0.38	0.38	0.5	0.25	0.17	0.13	0.29	0.5	0.5	0.38	0.38	0												
Rel7	0.38	0.38	0.5	0.25	0.17	0.13	0.29	0.5	0.5	0.38	0.38	0	0											
Tq15	0.5	0.5	0.5	0.63	0.67	0.5	0.71	0.88	0.5	0.63	0.63	0.63	0.63	0										
Tq120	0.13	0.13	0.25	0.13	0.33	0.13	0.14	0.5	0.5	0.38	0.38	0.25	0.25	0.63	0									
Aacl	0.86	0.86	0.86	0.86	1	0.86	0.83	0.86	0.8	1	1	0.86	0.86	0.86	0.86	0								
AaclII	0.86	0.86	0.86	0.86	1	0.86	0.83	0.86	0.8	1	1	0.86	0.86	0.86	0.86	0.71	0							
AaclIII	0.86	0.86	0.86	0.86	1	0.86	0.83	0.86	0.8	1	1	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.14	0						
Arl3	0.13	0.13	0.25	0.38	0.5	0.38	0.43	0.63	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.86	0.86	0.86	0					
BR	0.88	0.88	0.88	0.88	1	0.88	0.86	1	0.83	0.88	0.88	1	1	0.88	0.88	1	0.86	0.86	0.88	0				
Allo2	0.88	0.88	0.88	0.88	1	0.88	0.86	1	0.83	0.88	0.88	1	1	0.88	0.88	1	0.71	0.71	0.88	0.25	0			
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.83	0.83	1	0.43	0.29	0		
G82	1	1	1	1	0.83	0.86	1	1	0.8	0.86	0.86	0.86	0.86	0.71	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
Eu1b	0.71	0.71	0.71	0.86	1	0.86	0.83	1	0.83	0.86	0.86	1	1	0.86	0.71	1	1	1	0.67	0.86	0.86	1	0.83	0

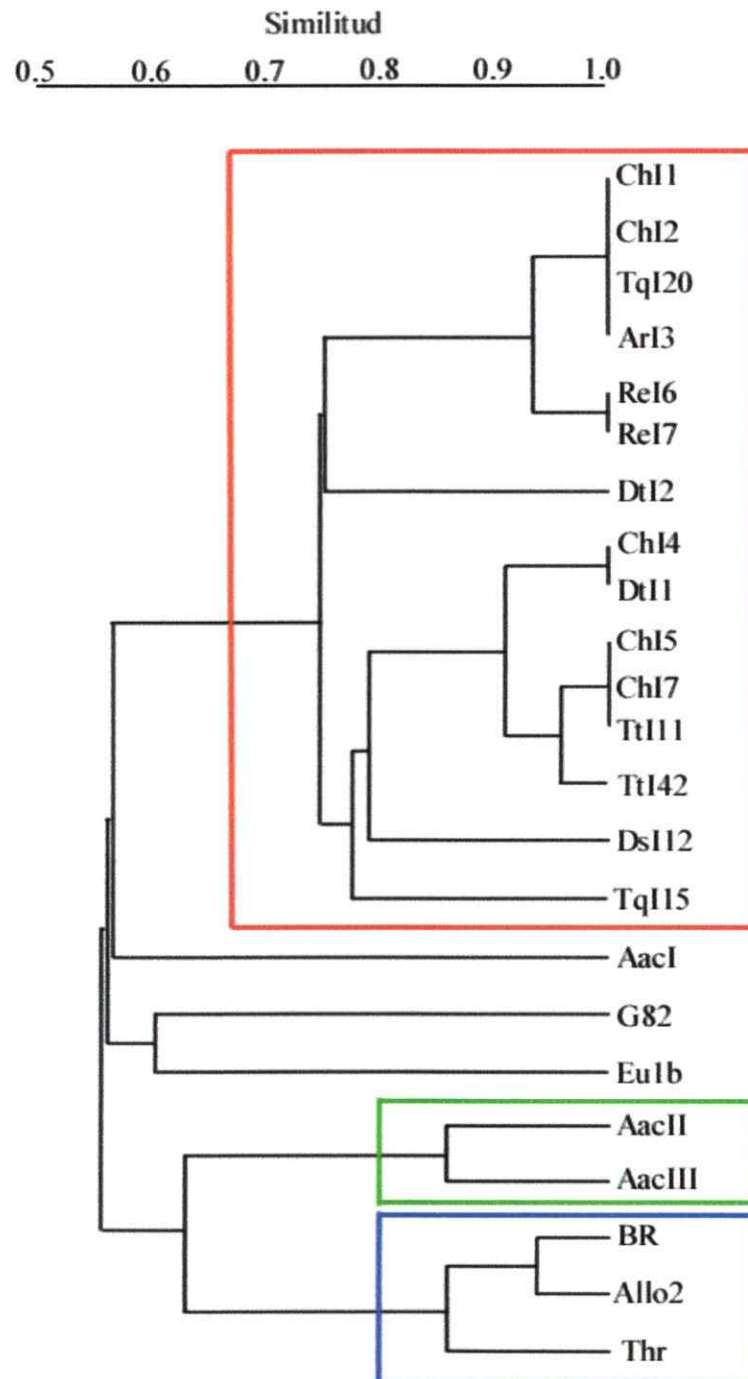


Fig. 9. Dendrograma construido usando coeficientes de similitud de Jaccard basado en la variación de 8 sistemas enzimáticos y un análisis de cluster UPGMA.

El dendrograma obtenido mediante análisis de UPGMA muestra al menos tres grupos (Fig. 9). El Grupo I está compuesto por todas las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae y la cepa ArI3 (Betulaceae) que mostró un fenotipo idéntico o muy parecido a varias de las cepas de esta familia; el Grupo II reúne a las cepas aisladas de la familia Betulaceae (AacII y AacIII). La tercera cepa de este grupo AacI, se encuentra alejada de las otras dos en una rama independiente indicando una mayor distancia genética dentro de este grupo. El Grupo III está compuesto por cepas aisladas de la familia Casuarinaceae (BR, Allo2 y Thr) con la cepa G82 cayendo fuera de este grupo. La cepa EuIb (Elaeagnaceae) no forma parte de ningún grupo mostrando una mayor distancia genética de las otras familias y encontrándose en una rama independiente.

Es evidente del dendrograma que las diferencias interfamilia son mayores que las que se encuentran intrafamilia, quedando claro que dentro de la familia Rhamnaceae existe un bajo polimorfismo enzimático multilocus. Se encontró que dentro de este grupo muchas de las cepas presentan fenotipos electroforéticos idénticos y por lo tanto en el dendrograma aparecen con un coeficiente de similitud de 1. Estas incluyen ChI1, ChI2, TqI20 y ArI3 entre otras.

3.2. Análisis del rDNA 16S

Para confirmar la identidad genética de algunas cepas de *Frankia*, utilizadas en este estudio, se realizó un análisis filogenético comparando las secuencias del rDNA 16S. Secuencias de un fragmento de 378 bp del rDNA 16S de seis cepas de *Frankia* aisladas de plantas de Rhamnaceae nativas (ChI1, ChI4, DtI1, ReI7, TqI20, TtI42) y dos cepas aisladas desde nódulos de *Alnus acuminata* (Betulaceae) (AacI y AacII) fueron

alineadas con 21 secuencias publicadas y obtenidas del NCIB GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Estas secuencias corresponden a cepas de *Frankia* aisladas de representantes de las familias Betulaceae (*Alnus* sp.), Myricaceae (*Myrica* sp., *Comptonia* sp.), Casuarinaceae (*Casuarina* sp.), Rhamnaceae (*Talguenea* sp., *Colletia* sp., *Discaria* sp., *Retanilla* sp., *Trevoa* sp., *Ceanothus* sp.), Elaeagnaceae (*Elaeagnus* sp.) y Rosaceae (*Purshia* sp.) y se indican en la Tabla 6. El alineamiento de todas las secuencias se muestra en la Tabla 7, y se observa la delección de 2pb en las posiciones 50 y 51 descrita previamente como característica del cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae (Clawson *et al.*, 1998). Es evidente desde el punto de vista de identificación de cepas de *Frankia*, que esta herramienta necesita ser utilizada en conjunto con otros métodos de identificación ya que las diferencias existentes dentro de este grupo de organismos son muy baja y por lo tanto no sirve para discriminar entre cepas estrechamente relacionadas.

A partir de los datos de secuencia se construyó un árbol filogenético usando el análisis de Neighbor Joining del programa TREECON (Van de Peer & De Wachter, 1993) con un análisis de bootstrapping de 500 réplicas para determinar la robustez de cada nodo (Fig. 10). Como grupo externo se utilizó *Geodermatophilus obscurus*. El árbol filogenético muestra tres grupos principales. En un primer cluster se encuentran las secuencias de *Frankia* que se asocian simbióticamente con plantas de las familias Elaeagnaceae y Rhamnaceae incluyendo las cepas aisladas de árboles nativos. En un segundo cluster se agrupan las secuencias de cepas provenientes de las familias Myricaceae, Betulaceae y Casuarinaceae. Finalmente hay un tercer grupo que reúne a

Tabla 6. Secuencias de 16S rDNA utilizadas en este estudio

Cepas de <i>Frankia</i>	Localidad	No. acceso GenBank
Rhamnaceae		
<i>Ceanothus griseus</i> nod	Nueva Zelanda	U54608
<i>Colletia hystrix</i> cepa ChI1	Caleu, Santiago, Chile	Este estudio
<i>Colletia hystrix</i> cepa ChI4	El Romeral, Chile	Este estudio
<i>Colletia hystrix</i> cepa ChI5	Caleu, Santiago, Chile	AF064148
<i>Discaria serratifolia</i> cepa DsI12	Concepción, Chile	AF064149
<i>Discaria trinervis</i> cepa DtI2	Bariloche, Argentina	AF064146
<i>Discaria trinervis</i> cepa DtI1	Bariloche, Argentina	Este estudio
<i>Retanilla ephedra</i> cepa ReI6	Cuesta La Dormida, Santiago, Chile	AF064150
<i>Retanilla ephedra</i> cepa ReI7	Cuesta La Dormida, Santiago, Chile	Este estudio
<i>Talguenea quinquinervia</i> cepa TqI15	Río Clarillo, Santiago, Chile	AF064147
<i>Talguenea quinquinervia</i> cepa TqI20	Río Clarillo, Santiago, Chile	Este estudio
<i>Talguenea quinquinervia</i> nod	Chile	AF063643
<i>Trevoa trinervis</i> cepa TtI11	Las vertientes, Santiago, Chile	AF064151
<i>Trevoa trinervis</i> cepa TtI42	Caleu, Santiago, Chile	Este estudio
Elaeagnaceae		
<i>Elaeagnus angustifolia</i> nod	Willington, Connecticut	AF064144
<i>Elaeagnus</i> sp. nod	University Of Chile, Santiago	AF064145
Betulaceae		
<i>Alnus acuminata</i> cepa AacI	Tucumán, Argentina	Este estudio
<i>Alnus acuminata</i> cepa AacII	Tucumán, Argentina	Este estudio
<i>Alnus glutinosa</i> nod	Nueva Zelanda	U82101
<i>Alnus acuminata</i> nod	Argentina	AF116172
<i>Alnus glutinosa</i> nod	Chile	AF116171
<i>Alnus viridis</i> nod	Nueva Zelanda	U82103
Myricaceae		
<i>Myrica gale</i> nod	Suecia	AF116075
<i>Myrica pensylvanica</i> nod	New Jersey	AF116076
<i>Comptonia peregrina</i> nod	Connecticut	AF116077
Casuarinaceae		
<i>Casuarina equisetifolia</i> nod	Nueva Zelanda	U82104
Rosaceae		
<i>Purshia tridentata</i>	Palmerston North, Nueva Zelanda	U54611
Outgroup		
<i>Geodermatophilus obscurus</i>		L40620

270

ChiI
 Chi4
 DtiI
 ReI7
 Tqi20
 Tti42
 Aaci
 Aacii
C. griseus nod
E. pungens nod
A. glutinosa nod
P. tridentata n
M. gale nod
C. equisetifolia
 Consensus

181
 c t
 c t
 c t
 c t
 c t
 c t
 c t
 a c
 a c
 c t
 c t
 c c
 c t
 c c
 c c
 c c
 c c
 -T-GGGATGG GCCCGGGGCC TATCAGCTTG TTGGTGGGGT -A-GCCCTAC CAAGGGGACG ACGGGTAGCC GGCCTGAGAG GCGGA-CGGC

g t
 g t
 g t
 g t
 g t
 g t
 g t
 g t
 g t
 a c
 g t
 g c
 g c
 a c
 g t
 g t

271
 -T-GGGATGG GCCCGGGGCC TATCAGCTTG TTGGTGGGGT -A-GCCCTAC CAAGGGGACG ACGGGTAGCC GGCCTGAGAG GCGGA-CGGC

360

ChiI
 Chi4
 DtiI
 ReI7
 Tqi20
 Tti42
 Aaci
 Aacii
C. griseus nod
E. pungens nod
A. glutinosa nod
P. tridentata n
C. equisetifolia
 Consensus

360
 n nnnnnnnnnn nnnnnnnccc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctg-ac gcagcgacgc
 a aagc-----
 g aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 g aagcctgacg cagcgacgcc
 g aagcctgacg cagcgacgcc
 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTTGG CAATGGGGCG -AAGCCTGACG CAGCGACGCC

n nnnnnnnnnn nnnnnnnccc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctg-ac gcagcgacgc
 a aagc-----
 g aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 a aagcctgacg cagcgacgcc
 g aagcctgacg cagcgacgcc
 g aagcctgacg cagcgacgcc

	361		378
Chi1	g	tnnnnnnn	tnnnnnnn
Chi4	a	t	cg
Dti1	a	t	cg
Rei7	a	t	cg
Tqi20	a	t	cg
Tti42	a	t	cg
Aaci	a	t	cg
Aacii	-----	-----	-----
<i>C. griseus</i> nod	g	t	ag
<i>E. pungens</i> nod	g	t	ag
<i>A. glutinosa</i> nod	a	t	cg
<i>P. tridentata</i> n	g	t	ag
<i>M. gale</i> nod	g	t	cg
<i>C. equisetifolia</i>	g	t	cg
Consensus	GCGTG-GGGA	-GA--GCC	

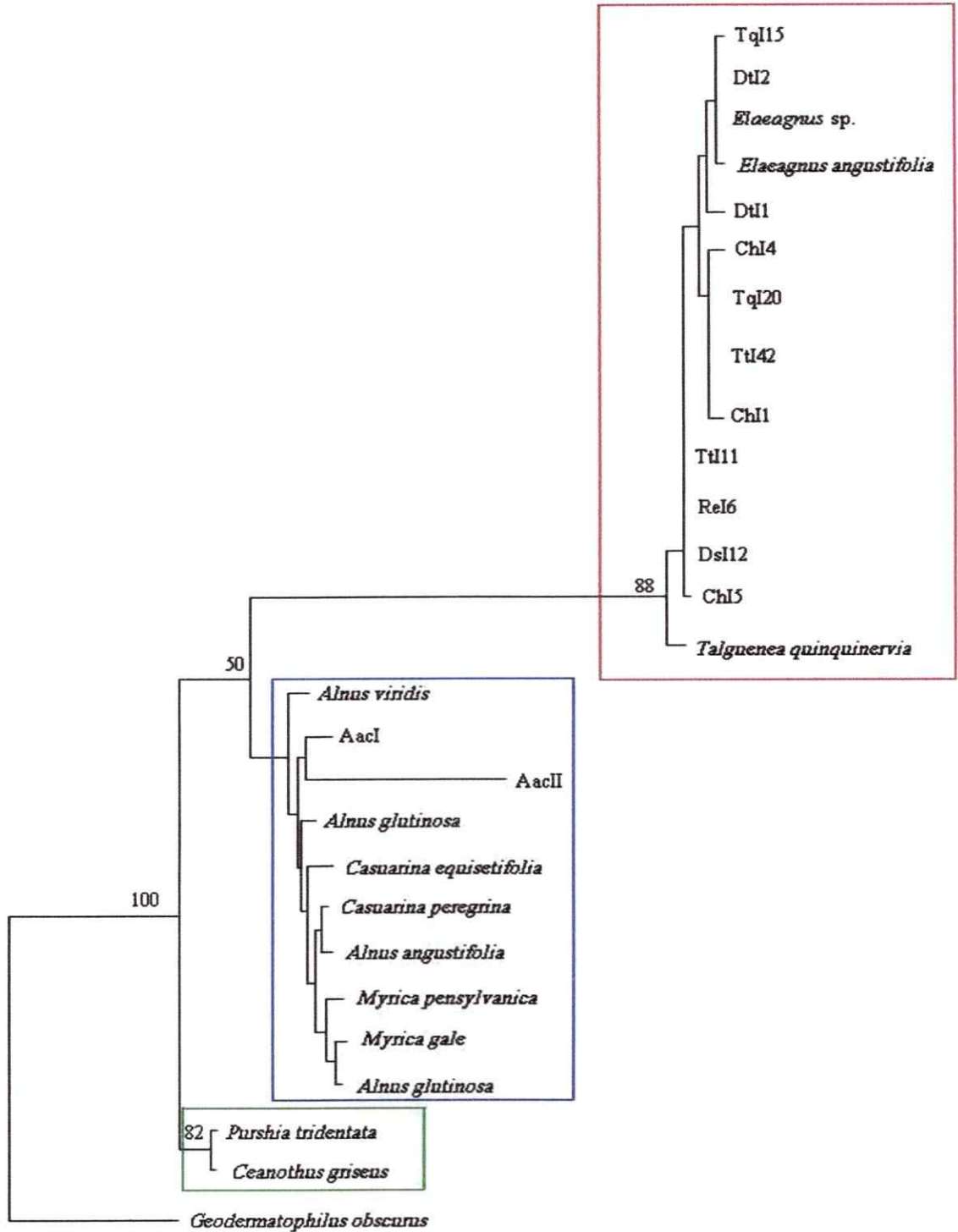


Figura 10. Arbol filogenetico basado en secuencias de 16S rDNA obtenidas por el algoritmo de Neighbor Joining con los valores correspondientes a 500 replicas

Ceanothus griseus (Rhamnaceae) y *Purshia tridentata* (Rosaceae) ambos aislados a partir de nódulos (Fig. 10).

Dentro del grupo de cepas aisladas de Rhamnaceae y analizadas según su secuencia de 16S rDNA, el género *Ceanothus* es el único que se encuentra en Norteamérica, mientras que los otros géneros de esta familia se encuentran al sur del continente siendo muchos de ellos endémicos (Carú, 1993).

3.3. Especificidad de Huésped

3.3.1. Ensayo de nodulación (infectividad)

La tabla 8 muestra el porcentaje de nodulación en las dos plantas huéspedes *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) y *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae) inoculadas con las cepas de *Frankia* estudiadas. Todos los nódulos encontrados mostraron las estructuras coraloides características de los nódulos actinorrícicos inducidos por cepas de *Frankia*. El control no inoculado no mostró nodulación para ninguna de las dos plantas huéspedes.

Todas las cepas de *Frankia* aisladas desde plantas nativas de Rhamnaceae resultaron ser infectivas en los ensayos de nodulación sobre *Trevoa trinervis*, que se usó como planta huésped para medir la infectividad sobre la familia Rhamnaceae.

Los ensayos de nodulación sobre la planta hospedera heteróloga *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae), mostraron que todas las cepas de *Frankia* derivadas de la familia Rhamnaceae también fueron capaces de inducir la formación de nódulos radiculares. Así, cepas de *Frankia* aisladas de *Colletia hystrix* (ChI1, ChI2, ChI4 y ChI5) infectaron *E. angustifolia* induciendo nódulos en un alto porcentaje de plantas

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

Inóculo ^a	Plantas huésped	
	<i>T. trinervis</i>	<i>E. angustifolia</i>
Control ^b	0	0
Rhamnaceae		
ChI1	50	80
ChI2	60	65
ChI4	ND	100
ChI5	ND	100
TqI15	70	100
TqI20	60	70
DtI1	ND	100
DtI2	10	15
DsI12	30	ND
TtI11	65	40
TtI40	ND	40
TtI42	100	55
ReI6	45	85
ReI7	ND	35
Elaeagnaceae		
Eu1b	85	100
Betulaceae		
AacI	0	0
AacIII	0	0
Casuarinaceae		
BR	0	0
Allo2	0	0
Thr	0	0

^a 5 ml de una suspensión bacteriana en Hoagland $\frac{1}{4}$ sin nitrógeno
^b no inoculado.
 ND = no determinado
 Número total de plantas inoculadas en cada ensayo = 20

que en el caso de ChI4 y ChI5 fue de 100%. Las cepas TqI15 y TqI20 aisladas de *Talguenea quinquinervis* también mostraron altos porcentajes de nodulación en ambas plantas hospederas.

Resultados de cepas aisladas de plantas del género *Discaria* sp. (DtI1, DtI2 y DsI12) mostraron un menor porcentaje de nodulación excepto la cepa DtI1 que noduló el 100% de las plantas de *E. angustifolia*. Dos cepas aisladas de *Trevoa trinervis* (TtI11 y TtI40) mostraron un porcentaje moderado de nodulación cuando se examinó *E. angustifolia*, de un 40%, mientras TtI42 noduló estas plantas en un 55%. Asimismo, las cepas aisladas de *Retanilla ephedra* ReI6 y ReI7 nodularon *E. angustifolia* con un 85% y 35% respectivamente.

Dentro de la familia Betulaceae, las cepas aisladas de *Alnus acuminata* (AacI y AacIII) y *Alnus rubra* (ArI3) no fueron capaces de infectar ni inducir nódulos en las dos plantas huésped.

La cepa EuIb aislada de *Elaeagnus umbellata* se utilizó como control positivo sobre *E. angustifolia* obteniéndose un 100% de nodulación. Esta cepa también fue capaz de nodular *T. trinervis* en un 85%, indicando que las cepas derivadas de plantas de ambas familias (Rhamnaceae - Elaeagnaceae) pertenecen al mismo grupo de especificidad de hospedero (HSG 3) y constituirían un grupo de inoculación cruzada. Por otra parte, las cepas aisladas desde plantas de la familia Casuarinaceae (BR, Allo2 y Thr) y Betulaceae (AacI) no fueron capaces de inducir nodulación en ninguna de las dos plantas huéspedes.

3.3.2. Ensayo de efectividad

La efectividad de las cepas se midió como la capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con la planta huésped. La actividad de la enzima nitrogenasa se midió mediante el ensayo de reducción de acetileno a etileno. La Tabla 9 muestra la efectividad de las cepas en simbiosis con *Trevoa trinervis* y *Elaeagnus angustifolia* como representantes de las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae respectivamente. El control negativo no muestra nodulación y las raíces no noduladas no tienen actividad de reducción de acetileno.

Las cepas de *Frankia* aisladas de Rhamnaceae no sólo resultaron infectivas en ambas plantas huéspedes utilizadas, sino también efectivas en la fijación de nitrógeno. Los nódulos inducidos en *T. trinervis* exhibieron diferente actividad específica de nitrogenasa dependiendo de la cepa utilizada. Todas las cepas estudiadas mostraron actividad nitrogenasa con valores entre 13 - 213 nmol de C₂H₄ por hora por planta. Las cepas ChI1, TtI11 y TtI42 derivadas de *T. trinervis* presentan la mayor actividad de reducción de acetileno en el huésped de la familia Rhamnaceae. Todas las cepas de *Frankia* aisladas de la familia Rhamnaceae fueron también capaces de inducir nódulos en *E. angustifolia* siendo más efectivas en la fijación de nitrógeno sobre esta planta huésped que sobre las plantas pertenecientes a la familia Rhamnaceae.

Los valores mas altos de actividad nitrogenasa se obtuvieron para la cepa ChI4 en simbiosis con *Elaeagnus angustifolia* (Tabla 9).

Los resultados muestran inoculación cruzada entre miembros de las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae. Asimismo, la cepa control Eu1b aislada desde *Elaeagnus*

Tabla 9. Efectividad de las cepas de *Frankia* en simbiosis

Cepa	<u>Actividad de nitrogenasa (ARA)^b</u>	
	<i>Trevoa trinervis</i>	<i>Elaeagnus angustifolia</i>
Control	0.0	0.0
Rhamnaceae		
ChI1	123.12 ± 6.4	279.50 ± 11.7
ChI2	23.52 ± 5.2	186.90 ± 8.3
ChI3	ND	61.60 ± 6.7
ChI4	ND	1013.84 ± 11.7
TqI15	13.43 ± 1.7	185.64 ± 11.0
TqI20	18.48 ± 3.2	379.31 ± 11.9
DtI1	ND	248.06 ± 9.5
TtI11	105.75 ± 6.5	663.74 ± 11.8
TtI42	213.07 ± 8.3	341.10 ± 11.8
ReI6	40.60 ± 4.1	253.64 ± 9.7
Elaeagnaceae		
EuIb	22.95 ± 5.2	162.84 ± 9.7

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

^b Actividad de reducción de acetileno por planta (ARA) fue expresada como nmol C₂H₄ h⁻¹ mg⁻¹ por planta ± SE

ND = no determinado

umbellata (Elaeagnaceae) también resultó ser infectiva y efectiva sobre *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae), aunque con una baja actividad de reducción de acetileno (Tabla 9).

4. DISCUSION

4.1 Polimorfismo Multienzimático

El estudio de la diversidad genética de microorganismos mediante polimorfismo enzimático multilocus (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) ha sido utilizado con diversos propósitos, ya sea para estudios en genética y sistemática (Ho *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1999), para la identificación de aislados (Rosa *et al.*, 2000; Engvild & Nielsen, 1985) o para determinar la extensión de variabilidad en poblaciones bacterianas naturales (Triana *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 1989).

Nuestro propósito en este estudio fue caracterizar los fenotipos electroforéticos de un grupo de cepas de *Frankia* aisladas de la familia Rhamnaceae y determinar la extensión de su diversidad comparada con cepas aisladas de plantas de otras familias de plantas actinorrhizas. Aun cuando se ensayaron muchos sistemas enzimáticos, solo ocho se incluyeron en el análisis final ya que daban resultados reproducibles y la mayoría de las cepas mostraban actividad. El análisis de los patrones enzimáticos con cada uno de los sistemas ensayados se realizó comparando el patrón de bandeo total (fenotipo electroforético) y no bandas individuales (electromorfos). Esta forma de análisis no sobrestima la variabilidad. Otro aspecto del análisis considera que aquellas cepas en las cuales la actividad enzimática no fue detectada (nd) después de tres ensayos independientes se consideraron como alelos nulos.

Los datos muestran que existe un bajo polimorfismo enzimático entre las cepas derivadas de la familia Rhamnaceae. La diversidad promedio de electromorfos

(H) dentro del grupo es de aproximadamente 0.35 lo cual muestra una gran similitud entre las cepas de Rhamnaceae quedando agrupadas en el dendrograma con un coeficiente de similitud superior a 0.75. La homogeneidad observada dentro del grupo de cepas aisladas desde plantas de la familia Rhamnaceae es claramente visible en los fenotipos electroforéticos donde la mayoría de las cepas comparten el mismo electromorfo (Tabla 3). Sin embargo, una excepción la constituyen las cepas TqI15 y DsI12 las cuales mostraron diferentes electromorfos para varios de los sistemas analizados.

Aún cuando existe una gran homogeneidad de estas cepas, algunos sistemas enzimáticos fueron útiles para discriminar entre cepas aisladas desde un mismo género, es así como con el sistema de MDH se pudo discriminar entre las cepas TtI42 y TtI11, mientras para las cepas TqI15 y TqI20, los sistemas MNR, α -EST, β -EST, IDH y PGM mostraron distintos fenotipos electroforéticos (Tabla 3).

El dendrograma obtenido permite distinguir al menos tres grupos, encontrándose aún suficiente variabilidad genética dentro de cada uno de ellos (Fig. 9). Un grupo incluye las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae, un segundo grupo reúne a las cepas pertenecientes a la familia Betulaceae y un tercer grupo incluye las cepas derivadas de la familia Casuarinaceae.

Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos morfológicos y fisiológicos hechos en estas cepas que muestran pocas diferencias (Carú, 1993). La extensión de diversidad de las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae parece no ser muy amplia. Esta falta de variación genética en cepas cultivadas se podría deber a la fuerte selección impuesta al momento de aislar y cultivar las cepas, ya que se seleccionan aquellas que son más exitosas en su crecimiento en los medios de cultivo

diseñados. Es así como la mayoría de las cepas derivadas de Rhamnaceae fueron aisladas en medio con glucosa como única fuente de carbono (Carú, 1993), lo cual impone una restricción a cepas que prefieren fuentes de carbono alternativas, como ácidos grasos.

Asimismo desde el punto de vista filogenético usando el marcador molecular rDNA 16S las cepas de Rhamnaceae bajo estudio se encuentran formando un cluster muy distintivo con un bajo número de sitios variables en la secuencia analizada (Tabla 7). Estos análisis además mostraron que en este cluster también se encuentran cepas aisladas de la familia Elaeagnaceae, como se describió previamente (Clawson *et al.*, 1998). Sin embargo, en los análisis enzimáticos la cepa aislada de *Elaeagnus umbellata*, Eu1b se encuentra más distante del cluster de Rhamnaceae y más bien cercana a la cepa G82 aislada de *Gymnostoma*, un género de la familia Casuarinaceae. Estudios previos del rDNA 16S y del espaciador intergénico *nifDK* han mostrado que cepas de *Frankia* aisladas de *Gymnostoma* son filogenéticamente más cercanas a cepas aisladas de *Elaeagnus* y muy distantes de cepas infectivas de *Casuarina* y *Alnus* (Navarro *et al.*, 1997). Además, en ensayos de inoculación, se demostró que cepas aisladas de *Gymnostoma* fueron capaces de nodular su propio huésped como también miembros de la familia Elaeagnaceae, pero no así *Casuarina* o *Allocasuarina*, ambos géneros en la familia Casuarinaceae (Navarro *et al.*, 1997). Estos datos apoyan lo encontrado en éste análisis enzimático y podrían explicar porque las cepas G82 y Eu1b se encuentran más cercanas según el dendrograma.

Por el contrario estudios previos en cepas de *Frankia* pertenecientes al grupo de especificidad de *Alnus* y *Elaeagnus* muestran un gran polimorfismo enzimático particularmente los patrones obtenidos de esterasas y diaforasa que contienen

numerosas bandas, lo que permitió identificar algunas cepas específicas (Gardes *et al.*, 1987). En nuestros datos, las cepas derivadas de *Alnus* también muestran un grado de heterogeneidad, siendo identificados en su mayoría por más de un electromorfo. Estas cepas forman parte de un cluster según el dendrograma (Fig. 9), sin embargo la cepa ArI3 constituye una excepción. Los sistemas enzimáticos analizados no discriminan la cepa ArI3 de las cepas de Rhamnaceae y por lo tanto se encuentra muy estrechamente relacionada con las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae y forma parte del cluster.

Las cepas AacI, AacII y AacIII aisladas de *Alnus acuminata* (Betulaceae) no forman un grupo estrechamente relacionado, ya que la cepa AacI se encuentra genéticamente distante de AacII y AacIII las cuales comparten un fenotipo electroforético muy parecido (Tabla 3). Estudios previos mostraron que estas cepas son muy parecidas tanto en su morfología, metabolismo e infectividad, sin embargo la cepa AacI aún cuando provenía del mismo lugar mostró diferencias en los sustratos utilizados para su crecimiento (Carú *et al.*, 2000). La cepa AacIII fue capaz de utilizar glucosa y sacarosa como fuente de carbono lo cual la podría colocar en el grupo A descrito por Lechevalier *et al.*, (1983) que incluye cepas que pueden utilizar mono- y disacáridos pero que no pueden utilizar ácidos orgánicos. Por otra parte, la cepa AacI podría ser asignada al grupo B ya que puede crecer en medios suplementados con ácidos orgánicos. Esta diferencia de metabolismo podría explicar en parte las diferencias observadas en los electromorfos presentes en estas cepas y por lo cual no formó parte de este cluster. Para el caso de las cepas aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae que se encuentran formando un cluster, todas ellas fueron descritas previamente como pertenecientes al grupo A (Carú, 1993). Lo cual

sugiere que la capacidad de *Frankia* para utilizar una determinada fuente de carbono establece diferencias que reflejan en su fenotipo electroforético.

La mayor diversidad reportada en otros grupos de cepas podría deberse en parte al origen de los aislados, los cuales tienen una amplia distribución geográfica y por otra parte en el que para muchas de las cepas no está indicado si todas son derivadas de una espora (cultivos monosporales), es decir cual es su grado de homogeneidad genética. En nuestro trabajo, todas las cepas aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae son derivadas de una espora y por lo tanto todos los cultivos tienen estructura clonal (Carú, 1993; Carú *et al.*, 1997). Este aspecto es muy relevante ya que *Frankia* es una bacteria filamentosa y se ha encontrado que dentro de un nódulo puede encontrarse más de una cepa del actinomicete y en tal caso los cultivos originados de estos aislados pueden ser heteroclonos (Schwencke & Carú, 2001).

En cuanto a la distribución geográfica, las cepas aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae provienen en su mayoría de la zona central de Chile, con una cepa proveniente de Concepción (DsI12) y dos cepas de Argentina (DtI1 y DtI2) (Tabla 2). Según los resultados obtenidos, no existe una relación entre las diferencias observadas en las cepas y su ubicación geográfica, ya que por ejemplo la cepa ChI5 obtenida de El Romeral (Cordillera de los Andes) presenta el mismo patrón electroforético que la cepa ChI7 obtenida de Caleú (Cordillera de la Costa).

Un grupo de cepas muy homogéneas con una baja variabilidad según los fenotipos electroforéticos son las pertenecientes al grupo de especificidad de Casuarina (BR, Allo2 y Thr) las cuales comparten un mismo patrón electroforético en varios de los sistemas analizados (Tabla 3). En el dendrograma (Fig. 9) se

muestra que forman un cluster con un coeficiente de similitud de aproximadamente 0.85, lo que se podría esperar para una familia de cepas cuya distribución geográfica es bastante estrecha siendo nativas de Australia y el Pacífico (Benson & Clawson, 2000). Por otra parte, muchas de las cepas de *Frankia* fueron aisladas de plantas actinorrícas creciendo fuera de su distribución geográfica original y por lo tanto la baja diversidad encontrada puede ser una consecuencia del bajo número de plantas noduladas capaces de colonizar el nuevo hábitat.

Esta técnica utilizada es muy útil entonces para determinar las diferencias existentes entre cepas aisladas de distintas familias actinorrícas. Claramente, las cepas pertenecientes a la familia Rhamnaceae se diferencian del resto de las familias actinorrícas.

Un estudio previo de diversidad genética demostró que cepas derivadas de los géneros *Casuarina*, *Allocasuarina* y *Gymnostoma* podían distinguirse sobre la base de sus patrones electroforéticos de esterasas. Los resultados además sugirieron que los géneros *Casuarina* y *Allocasuarina* eran cercanos filogenéticamente, mientras que *Gymnostoma* estaba claramente separada (Girgis & Schwencke, 1993). Estos hallazgos son similares a los encontrados en este estudio, donde la cepa G82 (*Gymnostoma*) está genéticamente distante del resto del grupo de la familia Casuarinaceae (Fig. 9).

El análisis isoenzimático también ha sido utilizado en otros grupos de organismos para la identificación de cepas usando geles de almidón y/o poliacrilamida. En un estudio hecho en cepas de *Penicillium nodositatum*, se utilizó la caracterización isoenzimática para determinar la variabilidad interespecífica en poblaciones naturales (Faure-Raynaud *et al.*, 1991). El análisis hecho en geles de

acrilamida-agarosa mostró una gran heterogeneidad entre cepas de *P. nodositatum*, ya que de las 17 cepas probadas, 10 mostraron su propio fenotipo electromórfico. Además, dos cepas estrechamente relacionadas con *P. nodositatum* según características morfológicas, fisiológicas y citológicas mostraron ser más distantes de acuerdo con los patrones isoenzimáticos donde *P. variable* y *P. verruculosum* no mostraron ningún electromorfo en común con las cepas de *P. nodositatum* (Faure-Raynaud *et al.*, 1991).

Este mismo tipo de análisis también ha sido utilizado para evaluar la relación genética entre cepas de la misma especie como en algunos casos de estudios epidemiológicos (Soll, 2000). Lo importante de esta técnica radica en seleccionar enzimas que permiten una mayor discriminación entre cepas. La técnica de MLEE se utilizó para “fingerprinting” de *Candida albicans* lo cual se verificó por un análisis de cluster de un grupo de aislados en el cual resultados de MLEE, RAPD y Southern blot se compararon y se comprobó que los resultados concordaban (Pujol *et al.*, 1997).

Esta técnica de polimorfismo enzimático multilocus podría ser útil para seguir a cepas de *Frankia* en el suelo, ya que se ha demostrado que los fenotipos electroforéticos son estables después de inoculación, nodulación y un posterior aislamiento de las cepas. También se demostró la sensibilidad de la técnica utilizando cepas resistentes a kanamicina y sus respectivas cepas parentales sensibles a kanamicina (Selim & Schwencke, 1994).

4.2 Análisis del rDNA 16S

Otra de las maneras utilizadas para deducir las relaciones filogenéticas entre organismos es vía la comparación de secuencias del rDNA 16S. El uso de los RNAs ribosomales, particularmente los genes del RNA ribosomal 16S (rDNA 16S) en estudios evolutivos se debe a las siguientes características, (i) se encuentran en todos los organismos cumpliendo la misma función de síntesis de proteínas; (ii) su estructura secundaria y terciaria es altamente conservada; (iii) su estructura primaria, compuesta por regiones constantes y variables, permite su detección, amplificación y secuenciación, (iv) están presentes en las células en un alto número de copias, y (v) la aparente ausencia de transferencia horizontal (Akkermans, 1998; Woese, 1987).

En este estudio, se compararon las secuencias de un fragmento de 378pb, que previamente se había informado contiene el 45% de los sitios variables (Clawson *et al.*, 1998) del rDNA 16S de cepas aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae con las secuencias de otras cepas previamente publicadas (Tabla 6). Un alineamiento de estas secuencias muestra que existen muy pocas diferencias entre las secuencias de distintas cepas de plantas actinorrhizas y que el rDNA 16S es bastante conservado en esta región por lo tanto, la secuencia de esta región permite confirmar la identificación de nuevas cepas de *Frankia* ya que se considera un carácter con valor taxonómico para *Frankia*. (Tabla 7).

La topología del dendrograma obtenido en este estudio (Fig. 10) concuerda con la encontrada en otros estudios, donde se observan tres clusters, un primer cluster agrupa a representantes de las familias Betulaceae, Casuarinaceae y Myricaceae; cepas aisladas de las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae forman un segundo cluster y *Ceanothus griseus*, un microsimbionte de la familia Rhamnaceae forma el

tercer cluster estando más relacionado con el microsimbionte que infecta a *Purshia tridentata* (Rosaceae) que con miembros aislados de la familia Rhamnaceae. Otros estudios también han encontrado resultados semejantes, aunque estos no contaban con los datos proporcionados en este estudio que muestran la formación de un cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae (Benson *et al.*, 1996; Clawson *et al.*, 1997; Nazaret *et al.*, 1991).

Si se comparan los dendrogramas obtenidos del análisis enzimático con el de las secuencias del 16S rDNA, se observa que en términos generales se encuentran grupos similares (Fig. 9 y 10). En ambos casos las cepas infectivas en Rhamnaceae forman un cluster aparte del resto de las cepas, y en el caso del 16S se encuentran agrupadas con cepas aisladas de la familia Elaeagnaceae. Esto se puede explicar por la poca variabilidad observada en las secuencias del 16S entre cepas que infectan a plantas actinorrhizas (Tabla 7).

Si se compara la filogenia de las cepas de *Frankia* con la filogenia de las plantas construidas a partir de la secuencia del gen cloroplasto ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (*rbcL*) se observa que las plantas actinorrhizas se distribuyen también en 4 grupos; Grupo I: Betulaceae, Casuarinaceae y Myricaceae; Grupo II: Coriariaceae y Datisceae; Grupo III: Rhamnaceae y Elaeagnaceae, y Grupo IV: Rosaceae (Swensen, 1996). Esta observación ha llevado a la propuesta de una co-evolución entre planta y simbionte para la fijación de nitrógeno (Simonet *et al.*, 1999).

La proximidad filogenética que muestran las cepas infectivas en Elaeagnaceae y Rhamnaceae se ha atribuido al origen filético común que presentan estas dos familias (Clawson *et al.*, 1998; Swensen, 1996).

4.3 Especificidad de Huésped

La asignación de grupos de especificidad de huésped (HSG) por Baker (1987) se hizo como una forma de esclarecer la taxonomía de *Frankia*. Estos grupos se asignaron mediante ensayos de inoculación cruzada, sin embargo, debido a las dificultades presentadas en la aislación, cultivo y mantención de muchas cepas como aquellas que infectan plantas de las familias Coriariaceae, Datisceae, Rosaceae y Rhamnaceae no se conoce su rango de huésped.

El establecimiento de la asociación *Frankia*-planta actinorrhiza es influenciado tanto por factores genéticos como abióticos. Factores genéticos incluyen la compatibilidad planta-huésped (Baker, 1987) como también la capacidad de formación de nódulos (Lechevalier *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 1985). Los factores abióticos incluyen nutrición con nitrógeno y pH, además de la presencia de otros organismos (Knowlton *et al.*, 1980).

Para los estudios de inoculación cruzada, *Trevoa trinervis* se eligió como una planta representativa de la familia Rhamnaceae y *Elaeagnus angustifolia* de la familia Elaeagnaceae. La elección de la planta huésped para probar estas cepas de *Frankia* se hizo en base a que estudios anteriores mostraron que el grupo de cepas de *Frankia* nativas inducían nodulación con una misma eficiencia sobre distintos miembros de la familia Rhamnaceae tal como *T. trinervis*, *Talguenea quinquinervis*, *Colletia hystrix* y *Retanilla ephedra* (Carú & Cabello, 1999). Además, otro reporte muestra que cepas aisladas de *Trevoa trinervis* (TtI11 y TtI12) fueron capaces de infectar su propio huésped (Carrasco *et al.*, 1995).

Se utilizaron cinco cepas de *Frankia* como controles positivos en los ensayos de inoculación, AacIII y ArI3 son infectivas en *Alnus glutinosa*, cepa Eu1b sobre

Elaeagnus angustifolia y las cepas BR y Allo2 sobre *Casuarina cunninghamiana*. Los resultados mostraron que bajo las condiciones de ensayo todas las cepas de la familia Rhamnaceae eran capaces de infectar tanto *E. angustifolia* como *T. trinervis* exhibiendo un nivel de promiscuidad muy parecido en el establecimiento de la simbiosis. Para muchas de las cepas estudiadas, el porcentaje de nodulación sobre *E. angustifolia* estaba sobre el 50%, donde las cepas ChI4, ChI5, TqI15 y DtI1 eran particularmente exitosas. Cabe notar que la cepa ChI4 parece tener un rango bastante amplio de infectividad siendo capaz de infectar además *Alnus* (Mosquera, 2002).

Los resultados son congruentes con el análisis filogenético basado en las secuencias del rDNA 16S (Benson *et al.*, 1996) donde se mostró que las cepas de *Frankia* derivadas de *Discaria* (Rhamnaceae) son más cercanas a los simbioses de los miembros de la familia Elaeagnaceae. De acuerdo a nuestros resultados las cepas de *Frankia* derivadas de la familia Rhamnaceae podrían pertenecer a la subdivisión del género de *Frankia* designada por Normand *et al.*, 1996 como cepas infectivas de Elaeagnaceae, formando así un cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae. Esta agrupación también se observa en nuestros estudios de electroforesis enzimática.

Las cepas de *Frankia* analizadas fueron infectivas y efectivas, y aún cuando se obtuvieron distintos valores para algunas cepas por ejemplo de *Trevoa trinervis* con relación a las otras cepas, no se puede concluir que las cepas de *T. trinervis* son las más infectivas ya que las diferencias en los porcentajes de nodulación no solo se deben a la capacidad del simbiote microbiano, sino también a la planta huésped. Dado que las plantas no son clonales ellas pueden reaccionar de manera diferente al establecimiento de la simbiosis. Reddell y Bowen (1985) aclaran que en la selección

de cepas, además de la dificultad que ofrece el aislamiento en cultivo puro, se agrega el hecho de que a veces, cepas de *Frankia* sp. altamente efectivas en la fijación de nitrógeno en una especie resultan ser inefectivas en otras.

Además de determinar su infectividad, también era importante conocer si los nódulos inducidos eran capaces de fijar nitrógeno, es decir comprobar su efectividad. Los valores obtenidos en la tabla 9 muestran que todos los nódulos ensayados fueron efectivos en la fijación de nitrógeno. Nuevamente, parece ser que algunas cepas son más exitosas en la fijación de nitrógeno que otras, por ejemplo para ChI4 el valor de actividad de nitrogenasa sobre *E. angustifolia* fue el más alto. Sin embargo, esta propiedad simbiótica depende de ambos organismos: bacteria y planta.

Los datos obtenidos muestran que todas las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae son infectivas y efectivas sobre el huésped de Elaeagnaceae y apoyarían la designación de cepas infectivas en Rhamnaceae al grupo HSG3 de Elaeagnaceae establecido por Baker (1987).

Hay cepas cuya asignación a un grupo de especificidad de huésped no es tan clara, como por ejemplo la cepa ChI4. Existe además otro estudio donde el huésped *Alnus glutinosa* se infectó con cepas aisladas de *Elaeagnus* sp., *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae) y *Colletia spinosissima* (Rhamnaceae), las cuales fueron capaces de inducir nódulos (Lumini *et al.*, 1992). En este caso se sugiere que hay factores asociados a la planta que permiten esta respuesta. Existen informes de otros casos en los cuales algunas cepas son más promiscuas denominadas cepas flexibles, como también huéspedes promiscuos.

Un estudio hecho en cepas aisladas de *Elaeagnus* sp. encontró que ellas eran capaces de nodular huéspedes de Elaeagnaceae y *Alnus* indicando que tienen un

amplio rango de huésped, pudiendo infectar especies pertenecientes a distintos HSGs (Bosco *et al.*, 1992). Por otra parte en un estudio de inoculación cruzada, cepas infectivas en *Gymnostoma* sp. un género de la familia Casuarinaceae, fueron capaces de nodular *Elaeagnus* pero no *Casuarina* (Navarro *et al.*, 1997), presentando una restricción en la infectividad.

En un estudio de invernadero, *Myrica* spp. nodulan con todas las cepas de *Frankia* ensayadas, las cuales incluyeron *Elaeagnus* sp., *Casuarina* sp. y *Alnus* sp., por lo tanto es un huésped promiscuo (Baker, 1987; Torrey, 1990). Estudios adicionales con el rDNA 16S muestran que en la naturaleza *M. pennsylvanica* tenía en sus nódulos cepas generalmente encontradas en nódulos de plantas de las familias que forman un cluster Betulaceae, Casuarinaceae y Myricaceae; cepas de un segundo grupo que incluye Elaeagnaceae y Rhamnaceae, y de un cuarto grupo de cepas tipo *Frankia* (Clawson & Benson, 1999). En el mismo estudio sin embargo, también se detectó que hay cepas que se especializan en infectar un solo huésped, como es el caso de *M. gale*, la cual exhibe una baja diversidad (Clawson & Benson, 1999).

Los datos de este estudio agrupan a cepas infectivas en Rhamnaceae y Elaeagnaceae en un cluster, esto concuerda con estudios de la filogenia de las plantas, donde estas dos familias también se encuentran formando un cluster según una serie de características tales como forma de vesícula, forma de septación y modo de infección (Swensen & Mullin, 1997).

A excepción de la cepa ChI4, que mostró un mayor rango de huésped, todas las otras cepas pertenecientes a la familia Rhamnaceae parecen estar más restringidas en cuanto a su diversidad de rango de huésped (Carrasco *et al.*, 1995; Carú & Cabello, 1999). El grado de promiscuidad se ha relacionado con la primera aparición

de las familias actinorrícicas. Registros fósiles muestran que la familia Myricaceae es la más antigua y por lo tanto la más promiscua. Es posible que la evolución tienda a la especialización de algunas cepas sobre las plantas.

Otro estudio hecho con cepas aisladas de rhamnáceas utilizó plantas de *Atriplex cordobensis* como huésped, un arbusto adaptado a suelos con escaso contenido de nitrógeno asimilable las cuales fueron inoculadas con cepas aisladas de *Colletia hystrix*, *Trevoa trinervis*, *Talguenea quinquinervia* y *Retanilla ephedra* (ReI4 y ReI6). Los resultados mostraron que se observaron hifas en todos los casos, vesículas en las plantas inoculadas de *C. hystrix* y *T. trinervis*, y esporangios en *R. ephedra* (Fabri *et al.*, 1996). Los resultados de efectividad simbiótica mostraron diferencias donde los valores mas altos se obtuvieron con la cepa de *C. hystrix*, mientras los menores fueron con la cepa ReI4. Además, la cantidad de nitrógeno fijado también fue mayor en plantas inoculadas con *C. hystrix*. Plantas inoculadas con *T. quinquinervia* mostraron un gran desarrollo aéreo, gran profusión de hojas y alta acumulación de biomasa pero con bajos niveles de contenido de nitrógeno, indicando que dicha cepa actuaría como una promotora del crecimiento vegetal (PGPR) mas que como un simbionte fijador de nitrógeno (Fabri *et al.*, 1996).

En nuestro laboratorio, también se analizó el efecto de la inoculación con distintas cepas sobre el crecimiento de las plantas. Algunos de los parámetros medidos fueron altura de tallo, peso seco y diámetro del tallo. Los resultados muestran que todas las plantas inoculadas tuvieron un mejoramiento con respecto a estos tres parámetros en comparación con el control no inoculado (Carú *et al.*, 2002). La respuesta de *E. angustifolia* fue particularmente buena.

Una de las aplicaciones prácticas de este estudio de inoculación es la búsqueda de parejas simbióticas más efectivas para beneficiar la reforestación de suelos áridos y contribuir mediante la implantación de estas especies inoculadas al mantenimiento y recuperación de estos frágiles ecosistemas. Esto requiere que no sólo sean de beneficio para el crecimiento de la planta sino también en la cantidad de nódulos que se podrían generar y la eficiencia con la cual fija nitrógeno.

APORTES DE LA TESIS

Los antecedentes bibliográficos indicaban que las cepas de *Frankia* derivadas de la familia Rhamnaceae son recalcitrantes al aislamiento y por lo tanto existen escasos datos sobre la biología de estas cepas. La mayoría de ellos están basados en los microsimbiontes de *Ceanothus* sp., los cuales aún no han sido cultivados en vida libre. Además, los estudios filogenéticos utilizando secuencias del rDNA 16S indicaban que algunos microsimbiontes que infectan plantas de la familia Rhamnaceae formaban parte del cluster compuesto por cepas aisladas de la familia Elaeagnaceae, sin embargo, *Ceanothus* (Rhamnaceae) aparece asociada a una cepa aislada de la familia Rosaceae.

En nuestro Laboratorio hemos establecido un cepario de *Frankia* aisladas desde plantas de la familia Rhamnaceae, el cual ha permitido establecer la filogenia de estas cepas (Clawson *et al.*, 1998) y conocer distintos aspectos de su biología.

En esta tesis se propuso establecer marcadores enzimáticos (MLEE) para identificar las distintas cepas de *Frankia* aisladas de la familia Rhamnaceae y discriminarlas de cepas de otras familias de plantas actinorrhizas. Los datos obtenidos muestran que existe heterogeneidad genética dentro del grupo de cepas y permite estimar la extensión del polimorfismo intra e interfamilia. El dendrograma construido da cuenta de los fenotipos observados y permite establecer que en conjunto con datos genéticos del tipo rDNA 16S se delimitan los mismos clusters. Así las familias Rhamnaceae y Elaeagnaceae se agrupan en un mismo cluster.

Otro aporte de la tesis es la asignación de algunas cepas al género *Frankia* mediante la secuencia del rDNA 16S. Este rasgo tiene valor taxonómico para la identificación de cepas del género y fue necesario completar esta característica para las cepas utilizadas en el estudio.

Un tercer aporte de la tesis fue establecer el grupo de infectividad de estas cepas mediante ensayos de inoculación cruzada. Los datos indican que estas ellas pertenecen al grupo de especificidad de huésped HSG3, formando así un grupo de infectividad con la familia Elaeagnaceae.

Los resultados obtenidos constituyen un punto de partida para la designación de especies en el género *Frankia* utilizando la taxonomía polifásica aplicada a bacterias, la cual incluye datos genotípicos y fenotípicos.

5. CONCLUSIONES

1.- Mediante el uso de marcadores enzimáticos multilocus se determinó que las cepas de *Frankia* nativas, aisladas de la familia Rhamnaceae se podían discriminar de las otras familias de plantas actinorrhizas formando un cluster separado del resto de las cepas aisladas de las familias Elaeagnaceae, Betulaceae y Casuarinaceae.

2.- El dendrograma obtenido muestra al menos 3 clusters, el cluster I está compuesto por todas las cepas aisladas de la familia Rhamnaceae y la cepa ArI3 (Betulaceae), el cluster II reúne a las cepas aisladas de la familia Betulaceae (AacII y AacIII) y el cluster III está compuesto por las cepas aisladas de la familia Casuarinaceae (BR, Allo2 y Thr). Sin embargo para las cepas AacI (Betulaceae), G82 (Casuarinaceae) y Eu1b (Elaeagnaceae) no fue posible asignarlas a ninguno de los cluster descrito. Ellas muestran una mayor distancia genética de sus respectivas familias y se encuentran en ramas independientes.

3.- La secuencia parcial del rDNA 16S de algunas cepas de *Frankia* de la familia Rhamnaceae presenta muy pocas diferencias con la secuencia de cepas aisladas de la familia Elaeagnaceae y confirma la asignación de estas cepas al cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae.

4.- Las cepas aisladas de plantas de la familia Rhamnaceae fueron capaces de infectar a plantas huéspedes de la familia Rhamnaceae (*Trevoa trinervis*) y Elaeagnaceae (*Elaeagnus angustifolia*) en ensayos de inoculación cruzada. Esto indica que estas cepas pertenecen al HSG3 y forman un cluster Rhamnaceae/Elaeagnaceae.

APENDICE

Solución de Hoagland 1X

Stock		con Nitrógeno	sin Nitrógeno
Micronutrientes		1ml	1ml
FeEDTA	0.02M	1ml	1ml
KNO ₃	1M	5ml	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	1M	2ml	2ml
KH ₂ PO ₄	1M	1ml	1ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	1M	-	5ml
KCl	1M	-	5ml
Ca(NO ₃) ₃ .4H ₂ O	1M	5ml	-

Completar a un litro con agua.

Solución de micronutrientes	g/l
H ₃ BO ₄	2.86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025
CoSO ₄ .7H ₂ O	0.001

Soluciones para tinciones específicas

Compuesto

NAD	10mg/ml H ₂ O
NADP	10mg/ml H ₂ O
NBT	10mg/ml H ₂ O
PMS	5mg/ml H ₂ O
DPIP	1mg/ml H ₂ O

Solución 1% α -naftil y β -naftil acetato

Disolver 1g en 50ml acetona, agregar 50ml de agua.

Guardar en frío.

Solución de ácido málico

134.1g DL-ácido málico, 80g NaOH, 1litro de agua.

Ajustar pH7.0 con 18ml de 4N NaOH.

Solución α -D-glucosa 1,6-difosfato

10mg/100ml en agua destilada.

BIBLIOGRAFIA

- Akkermans, A.D.L.** 1988. Molecular tools for tracking microorganisms in the environment. En N.S. Subba Rao y Y.R. Dommergues (eds.), *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. pp. 1-7. Oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD.
- An, C.S.; Wills, J.W.; Riggsby, W.S. & Mullin, B.C.** 1983. Deoxyribonucleic acid base composition of 12 *Frankia* isolates. *Can. J. Bot.* 61: 2859-2862.
- An, C.S.; Riggsby, W.S. & Mullin, B.C.** 1985. Restriction pattern analysis of genomic DNA of *Frankia* isolates. *Plant Soil* 87: 43-48.
- Baker, D.D.** 1987. Relationships among pure cultured *Frankia* strains on host specificity. *Physiol. Plantarum* 70: 245-248.
- Baker, D. & Mullin, B.C.** 1992. Actinorhizal symbioses. En Stacey, G.; R.H. Burris & H.J. Evans (eds.), *Biological Nitrogen Fixation*. pp. 259-292. Chapman & Hall. New York.
- Baker, D.D.; Pengelly, W.I. & Torrey, J.G.** 1981. Immunological analysis of relationships among the isolated Frankiae (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 148-151.
- Baker, D.D. & Schwintzer, C.R.** 1990. Introduction. En Schwintzer, C.R. & Tjepkema, J.D. (eds.), *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. pp. 3-11. Academic Press, Inc. California.
- Baker, D. & Seling, E.** 1984. *Frankia*: New light on an actinomycete symbiont. En J. Ortiz-Ortiz, L.F. Bojalil y V. Yakoleff (eds.), *Biological, biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. pp. 563-574. Academic Press, Orlando, Florida.
- Benoist, P.; Müller, A.; Diem, H.G. & Schwencke, J.** 1992. High-Molecular-Mass multicatalytic proteinase complexes produced by the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* strain BR. *J. Bacteriol.* 174: 1495-1504.
- Benson, D.R. & Clawson, M.L.** 2000. Evolution of the actinorhizal plants symbiosis. En *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A model system for analysis of a biological process*. pp. 207-224. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- Benson, D.R.; Buchholz, S.E. & Hanna, D.G.** 1984. Identification of *Frankia* strains by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 489-494.

- Benson, D.R.**; Stephens, D.W.; Clawson, M.L. & Silvester, W.B. 1996. Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou* and *Purshia tridentata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2904-2909.
- Berry, A.M.** 1994. Recent developments in the actinorhizal symbioses. *Plant Soil* 161:135-145.
- Berry, A.** & Torrey, J.G. 1979. Isolation and characterization *in vivo* and *in vitro* of an actinomycetous endophyte from *Alnus rubra* Bong. En J.C. Gordon, C.T. Wheeler y D.A. Perry (eds.), *Symbiotic Nitrogen Fixation in the management of temperate forests*. pp. 69-83. Forest research Laboratory, Oregon State University, Corvallis.
- Beyazova, M.** & Lechevalier, M.P. 1992. Low-frequency restriction fragment analysis of *Frankia* strains (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 422-433.
- Bloom, R. A.**; Mullin, B.C. & Tate, R.L. 1989. DNA restriction patterns and DNA-DNA solution hybridization studies of *Frankia* isolated from *Myrica pennsylvanica* (Bayberry). *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2155-2160.
- Bond, G.** & Becking, J.H. 1982. Root nodules in the genus *Colletia*. *New Phytol.* 90: 57-65.
- Bosco, M.**; Fernandez, M.P.; Simonet, P.; Materassi, R. & Normand. 1992. Evidence that some *Frankia* sp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1569-1576.
- Callaham, D.**; Del Tredici, P. & Torrey J.G. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199: 899-902.
- Carrasco A.**; Schwencke, J. & Carú, M. 1992. Isolation of *Frankia* from nodules of *Trevoa trinervis*: ultrastructural characterization. *Can. J. Microbiol.* 38: 174-180.
- Carrasco, A.**; Salyards, R. & Berry, M. 1995. Studies of two *Frankia* strains isolated from *Trevoa trinervis*. *Plant Soil* 171: 359-363.
- Carú, M.** 1993. Characterization of native *Frankia* strains isolated from chilean shrubs (Rhamnaceae). *Plant Soil* 157: 137-145.
- Carú, M.** 1995. Sporulation of two *Frankia* strains in submerged cultures. *Acta Microbiol.* 6: 145-151.
- Carú, M.**; Abarzúa, M. & Carrasco, A. 1990. Estructura fina de *Frankia*, cepas ChI1 y ChI2 aisladas de *Colletia hystrix* (Clos.). *Acta Microbiol.* 3 (1-2): 55-62.

Carú, M.; Becerra, A.; Sepúlveda, D. & Cabello, A. 2000. Isolation of infective and effective *Frankia* strains from root nodules of *Alnus acuminata* (Betulaceae). *World J. Micro. & Biotech.* 16: 647-651.

Carú, M. & Cabello, A. 1999. Infectivity and nitrogen fixation of the *Frankia* strains from Rhamnaceae. *Arid Soil Res. Rehabil.* 13: 53-59.

Carú, M.; Sepúlveda, D. & Cabello, A. 1997. Spore germination of *Frankia* strains isolated from *Colletia hystrix* and *Retanilla ephedra* (Rhamnaceae). *World J. of Microbiol. & Biotech.* 13: 219-224.

Carú, M.; Mosquera, G.; Bravo, L.; Guevara, R.; Sepúlveda, D. & Cabello, A. 2002. Host specificity of *Frankia* strains isolated from plant root nodules of the Rhamnaceae family. *Enviado a Plant Soil.*

Clawson, M.L. & Benson, D.R. 1999. Natural diversity of *Frankia* strains in actinorhizal root nodules from promiscuous hosts in the family Myricaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4521-4527.

Clawson, M.L.; Carú, M. & Benson, D.R. 1998. Diversity of *Frankia* Strains in Root nodules of Plants from the Families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3539-3543.

Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden press, New York.

Cruz-Cisneros, R. & Valdés, M. 1991. Actinorhizal root nodules on *Adolphia infesta* (H.B.K.) Meissner (Rhamnaceae). *Nitrogen Fixing Tree Res. Reprod.* 9: 87-89.

Dawson, J.O. 1986. Actinorhizal plants: their use in forestry and agriculture. *Outlook on Agriculture* 15: 202-208.

Delwiche, C.C.; Zinke, P.J. & Johnson, C.M. 1965. Nitrogen fixation by *Ceanothus*. *Plant Physiol.* 40:1045-1047.

Dobritsa, S.V. & Stupar, O.S. 1992. Genetic heterogeneity among *Frankia* isolates from root nodules of individual actinorhizal plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 287-292.

Engvild, K.C. & Nielsen, G. 1985. Strain identification in *Rhizobium* by starch gel electrophoresis of isoenzymes. *Plant Soil* 87: 251-256.

Fabri, S.; Caucas, V. & Abril, A. 1996. Infectividad y efectividad de distintas cepas de *Frankia* spp. sobre plantas de *Atriplex cordobensis*. *Rev. Arg. Microbiol.* 28: 31-38.

Faure-Raynaud, M.; Bonnefoy, M.A. & Moiroud, A. 1990. Diversity of *Frankia* strains

from actinorhizae of a single *Alnus rubra* cultivated in nursery. *Symbiosis* 8: 147-160.

Faure-Raynaud, M.; Daniere, C.; Moiroud, A. & Capellano, A. 1991. Intraspecific variability of isozymes in *Penicillium nodositatum* Valla, a fungus inducing 'myconodules' on the root system of *Alnus* sp. *Plant Soil* 137: 285-291.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

Fernandez, M.P.; Meugnier, H.; Grimont, P.A.D. & Bardin, R. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 424-429.

Gardes, M.; Bousquet, J. & Lalonde, M. 1987. Isoenzyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1596-1603.

Gauthier, D.; Frioni, L.; Diem, H.G. & Dommergues, Y. 1984. The *Colletia spinosissima*-*Frankia* symbiosis. *Acta Ecol.* 5: 231-239.

Girgis, M.G.Z.; Ishoe, Y.Z. & El-Haddad, M. 1990. First report on isolation and culture of effective *Casuarina* strains of *Frankia* from Egypt. In M.H. El-Lakany, J.W. Turnbull & J.L. Brewbaker. (eds.), *Advances in Casuarina Research Utilization*. pp. 156-164. Proceedings of 2nd International Casuarina Workshop. Desert Development Center. A.U.C. Cairo, Egypt.

Girgis, M.G.Z. & Schwencke, J. 1993. Differentiation of *Frankia* by their electrophoretic patterns of intracellular esterases and aminopeptidases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2225-2232.

Harrison, S.P.; Jones, D.G. & Young, J.P.W. 1989. *Rhizobium* population genetics: Genetic variation within and between populations from diverse locations. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1061-1069.

Ho, Y.W.; Khoo, I.Y.; Tan, S.G.; Abdullah, N.; Jalaludin, S. & Kudo, H. 1994. Isozyme analysis of anaerobic rumen fungi and their relationship to aerobic chytrids. *Microbiol.* 140: 1495-1504.

Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* N°347

Jamann, S.; Fernández, M.P. & Normand, P. 1993. Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol. Ecol.* 2: 17-26.

Lalonde, M. 1979. Immunological and ultrastructural demonstration of nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. host plant by an actinomycetal isolate from the

North American *Comptonia peregrina* (L.) Coult. root nodule. Bot. Gaz. (Chicago) 140 (Suppl.): 535-543.

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

Lechevalier, M.P.; Baker, D. & Horrière, F. 1983. Physiology, chemistry, serology and effectivity of two *Frankia* isolates from *Alnus incana* subsp. *rugosa*. Can. J. Bot. 61: 2826-2833.

Lumini, E.; Bosco, M.; Favilli, F. & Wheeler, C.T. 1992. Production of spores in nodules of *A. glutinosa* inoculated with non-host *Frankia* strains. Acta Oecol. 13: 506.

Medan, D. & Tortosa, R.D. 1981. Nódulos actinorrícicos en especies argentinas de los géneros *Kentrothamus*, *Trevoa* (Rhamnaceae) y *Coriaria* (Coriariaceae). Bol. Soc. Argent. Bot. 20: 71-80.

Meesters, T.M. 1987. Localization of nitrogenase in vesicles of *Frankia* sp. Cc 1.17 by immunological labelling on ultrathin chryosections. Arch. Microbiol. 146: 327-331.

Mirza, M.S.; Hahn, D.; Dobritsa, S.V. & Akkermans, A.D.L. 1994. Phylogenetic studies on uncultured *Frankia* populations in nodules of *Datisca cannabina*. Can. J. Micro. 40: 313-318.

Mosquera, G. 2002. Rango de huésped y variabilidad genética de cepas de *Frankia* aisladas de nódulos radiculares de plantas de la familia Rhamnaceae detectada mediante marcadores RAPDs y RFLP. Tesis de Magíster en ciencias Biológicas con mención en Microbiología.

Müller, A.; Benoist, P.; Diem, H.G. & Schwencke, J. 1991. Age-dependent changes in extracellular protein, aminopeptidase and proteinase activities in *Frankia* BR. J. Gen. Micro. 137: 2787-2796.

Murphy, R.W.; Sites, J.W.; Buth, D.G. & Haufler, C. 1996. Isoenzyme electrophoresis. En D.M. Hills, G. Moritz & B.K. Mable (eds.), Molecular Systematics. 2º ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Mass. U.S.A.

Murry, M.A.; Fontaine, M.S. & Torrey, J.G. 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFP ArI3 grown in batch culture. Plant Soil 78: 61-78.

Navarro, E.; Nalin, R.; Gauthier, D. & Normand, P. 1997. The nodular microsymbionts of *Gymnostoma* spp. are *Elaeagnus*-infective *Frankia* strains. Appl. Env. Microbiol. 63: 1610-1616.

Nazaret, S.; Simonet, P.; Normand, P. & Bardin, R. 1989. Genetic diversity among

Frankia isolated from *Casuarina* nodules. *Plant Soil* 118: 241-247.

Nazaret, S.; Cournoyer, B.; Normand, P. & Simonet, P. 1991. Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J. Bacteriol.* 173: 4072-4078.

Newcomb, W. & Wood, S.M. 1987. Morphogenesis and structure of *Frankia* (Actinomycetales): the microsymbiont of nitrogen fixing actinorhizal root nodules. *Int. Rev. Citol.* 109: 1-88.

Nittayajarn, A.; Mullin, B. & Baker, D. 1990. Screening of symbiotic Frankiae for host specificity by restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1172-1174.

Normand, P.; Orso, S.; Cournoyer, B.; Jeannin, P.; Chapelle, C.; Dawson, J.; Evtushenko, L. & Misra, A.K. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation on the family Frankiaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(1): 1-9.

Postgate, J.R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. En J.R. Morris y D.W. Robbins (eds.), *Methods in Microbiology*. pp. 343-356. Academic Press, London.

Pujol, C.; Joly, S.; Lockhart, S.; Noel, S.; Tibayrenc, M. & Soll, D.R. 1997. Parity of MLEE, RAPD and Ca3 hybridization as fingerprinting methods for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2348-2358.

Reddell, P. & Bowen, G.D. 1985. Do single nodules of Casuarinaceae contain more than one *Frankia* strain?. *Plant Soil* 88: 275-279.

Rosa, E.A.R.; Rosa, R.T.; Pereira, C.V.; Boriollo, M.F.G. & Höfling, J.F. 2000. Analysis of parity between protein-based electrophoretic methods for the characterization of oral *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 801-806.

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

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

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

Savouré, A. & Lim, G. 1991. Characterization of an infective *Frankia* (ISU0224887) isolated from nodules of *Gymnostoma sumatranum*. *Plant Soil* 131: 21-27.

Schwencke, J. & Carú, M. 2001. Advances in actinorhizal symbiosis: Host plant-*Frankia* interactions, biology, and applications in Arid land Reclamation. A review. *Arid Land Res. Manage.* 15: 285-327.

Schwintzer, C.R. 1990. Spore positive and spore negative nodules. En C.R. Schwintzer & J.D. Tjepkema (eds.), *The biology of Frankia and actinorhizal plants.* pp. 177-193. Academic press, San Diego, California.

Selim, S.H. & Schwencke, J. 1995. Simple and reproducible nodulation test for *Casuarina*-compatible *Frankia* strains: inhibition of nodulation and plant performance by some cations. *Arid Soil Res. Rehabil.* 9: 25-37.

Sellstedt, A.; Rosbrook, P.A.; Kang, L. & Reddell, P. 1994. Effect of carbon source on growth, nitrogenase and uptake hydrogenase activities of *Frankia* isolates from *Casuarina* sp. *Plant Soil.* 158: 63-68.

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

Shipton, W.A. & Burggraaf, A.J.P. 1982. A comparison of the requirements for various carbon and nitrogen sources and vitamins in some *Frankia* isolated. *Plant Soil* 69: 149-161.

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

Simonet, P.; Normand, P.; Moiroud, A. & Lalonde, M. 1985. Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids. *Plant Soil* 87: 49-60.

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

Soll, D.R. 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the Infectious fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 332-370.

Swensen, S.M. 1996. The evolution of Actinorhizal symbioses: Evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot.* 83(11): 1503-1512.

Swensen, S.M. & Mullin, B.C. 1997. Phylogenetic relationships among actinorhizal plants. The impact of molecular systematics and implications for the evolution of

actinorhizal symbioses. *Physiol. Plant.* 99: 565-573.

Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *Bioscience* 28: 586-592.

Torrey, J.G. 1985. The site of nitrogenase in *Frankia* in free-living culture and in symbiosis. En H.J. Evans, P.J. Bottomley & W.E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation Research Progress*. pp. 293-299. Dordrecht Martinus Nijhoff.

Torrey, J.G. 1990. Cross-inoculation groups within *Frankia* and host-endosymbiont associations. In: Schwintzer, C.R. & Tjepkema, J.D. (eds.), *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. pp. 83-106. Academic Press, Inc. California.

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

Triana, O.; Jaramillo, N. & Moreno, J. 1999. Genetic variability of Colombian populations of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Biol. Res.* 32: 1-10.

Van de Peer, Y. & De Wachter, R. 1993. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Applic. Biosci.* 9: 177-182.

Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelleher, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bact.* 173(2): 697-703.

Woese, C.R. 1987. *Bacterial Evolution*. *Micro. Rev.* 51(2): 221-271.