

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



TÍTULO

**“DIVERSIDAD GENÓMICA DE CEPAS DE *Frankia* DE DIFERENTES ORÍGENES
Y HOSPEDEROS MEDIANTE POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS
FRAGMENTOS AMPLIFICADOS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

PRESENTA

Q.F.B. ERIKA YANNETH ACOSTA CRUZ

Octubre 2004

Cd. Reynosa, Tam. México.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADO E INVESTIGACION

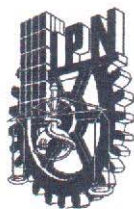
CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 01 del mes Octubre del año 2004, el (la) que suscribe Erika Yanneth Acosta Cruz alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B021092, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Alberto Mendoza Herrera, cede los derechos del trabajo intitulado Diversidad genómica de cepas de *Frankia* de diferentes orígenes y hospederos mediante Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Bldv. Del Maestro Esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Erika Yanneth Acosta Cruz

Nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps., siendo las 11:00 horas del día 01 del mes de Octubre del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores del Centro de Biotecnología Genómica para examinar la tesis de grado titulada:
Diversidad genómica de cepas de Frankia de diferentes orígenes y hospederos mediante Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

Presentada por el alumno:

Acosta
Apellido paterno

Cruz
materno

Erika Yanneth
nombre(s)

Con registro:

B0	2	1	0	9	2
----	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dr. Alberto Mendoza Herrera

Dra. María Valdés Ramírez

Dra. Ana M. Sifuentes Rincón

M.C. Ma. Antonia Cruz Hernández

Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. José Luis Hernández Mendoza

*A mi familia, por su gran amor, apoyo y ejemplo.
Por darme libertad para buscar mi destino. Por sus consejos. Porque los quiero*

*A Marco, por tu amor y comprensión.
Por apoyarme en todo. Por todo lo que compartimos. Porque te amo*

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la conclusión de esta etapa de mi vida.

A mi familia, especialmente a mi mamá, por todo su amor, por orientarme y alentarme siempre a seguir adelante, y a mis hermanos, por su cariño y por ser mi mayor motivo para tratar de ser una mejor persona. A Marco, por hacerme sentir siempre segura y darme energía para terminar mis metas. A Lupita, UKWIM.

A mis compañeros y amigos, por toda la ayuda que me brindaron en su momento, y por compartir tantos momentos agradables. Guacho, Chula, Nemo, gracias por estar ahí. Mapacha, Cholula, por ser tan raras como yo. Por su apoyo y amistad insustituibles. Por tantas ideas y tantas charlas compartidas...

Al equipo de B. Vegetal I, por compartir el día a día, por su amistad. A Toñita, por tener tanta paciencia al enseñarme las bases para trabajar en el lab.

A la Dra. María Valdés, por sus valiosos consejos, por esas charlas tan agradables. Por la confianza depositada en mí y su invaluable guía y apoyo.

Al Dr. Alberto Mendoza, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por toda la ayuda brindada.

A mi comisión revisora de tesis, por su crítica constructiva y su orientación.

Agradezco también a los proyectos 2002-CO1-5443 de CONACYT-CONAFOR y CGPI 2003-148 por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Y a ese ser maravilloso que nunca nos deja solos... GRACIAS

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONTENIDO	iii
ABREVIATURAS	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno.....	3
2.2 Plantas Actinorrícicas.....	4
2.3 El género <i>Frankia</i>	5
2.4 Aislamiento de <i>Frankia</i>	5
2.5 Morfología de los cultivos de <i>Frankia</i>	6
2.6 Clasificación taxonómica de <i>Frankia</i>	8
2.7 Impacto de las herramientas moleculares en la sistemática bacteriana.....	10
2.8 Principio del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP).....	11
2.9 Comparación del análisis por AFLP con otras técnicas.....	11
2.9.1 Reproducibilidad y solidez.....	12

2.9.2 Poder de discriminación.....	12
2.9.3 Tipificación.....	13
2.9.4 Aspectos operativos.....	14
2.10 Aplicaciones del AFLP en bacteriología.....	14
2.10.1 Taxonomía.....	15
2.10.2 Epidemiología.....	15
2.10.3 Ecología.....	16
2.10.4 Otras aplicaciones.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVO GENERAL.....	19
4.1. Objetivos particulares.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 Procedencia de los reactivos.....	20
5.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	20
5.2.1 Medios para propagación.....	21
5.3 Extracción de DNA cromosomal.....	22
5.4 Preparación del DNA molde para la amplificación por PCR.....	23
5.5 Reacciones de AFLP.....	24
5.6 Visualización de resultados.....	25
5.7 Análisis de los datos.....	26
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Extracción de DNA cromosomal.....	28

6.2 Reacciones de AFLP.....	28
6.3 Visualización de los productos de amplificación.....	29
6.4 Análisis de los datos.....	31
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES.....	41
9. RECOMENDACIONES.....	42
10. BIBLIOGRAFÍA.....	43
11. GLOSARIO.....	49

ABREVIATURAS

AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphisms”, Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados.
AP-PCR	“Arbitrarily Primed PCR”, PCR con iniciadores arbitrarios.
ARDRA	“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”, Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado.
DNA	“Desoxiribonucleic Acid”, Ácido desoxirribonucleico.
ERIC-PCR	“Enterobacterial Repetitive Intergenic consensus sequence based PCR”, PCR basada en secuencias repetidas consenso intergénicas enterobacterianas.
HSG	“Host Specificity Group”. Grupos de especificidad de hospedante.
LFRFA	“Low-Frequency Restriction Fragment Analysis”, Análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia.
PCR	“Polymerase Chain Reaction”, Reacción en cadena de la polimerasa.
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, Electroforesis en gel de campos pulsados.
RADP	“Random Amplified of Polymorphic DNA”. Análisis de amplificaciones al azar de DNA polimórficas.
rep-PCR	“Repetitive extragenic palindromic-PCR”, Huella genómica con blanco en secuencias palindrómicas repetidas.
RFLP	“Restriction Fragments Length Polymorphisms”. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.
UPGMA	“Unweighted Pair Group Arithmetic Mean Average”, Método de agrupamiento de medias no ponderadas.

LISTA DE CUADROS

	PÁG.
Cuadro 1. Grupos de infectividad de hospedero de <i>Frankia</i> (Baker,1987).....	8
Cuadro 2. Grupos de <i>Frankia</i> formados con base en el análisis de la secuencia del gen 16S.....	9
Cuadro 3. Cepas de <i>Frankia</i> de diferentes orígenes geográficos y hospedantes Incluidas en este estudio.....	21
Cuadro 4. Combinaciones de iniciadores utilizadas para la amplificación selectiva de AFLP.....	25
Cuadro 5. AMOVA de los datos AFLP de las cepas de <i>Frankia</i> con base en el HSG.....	35
Cuadro 6. AMOVA de los datos AFLP de las cepas de <i>Frankia</i> con base en su origen geográfico.....	36

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1	Morfología de <i>Frankia</i> 7
Figura 2	Visualización del DNA de <i>Frankia</i> 28
Figura 3	Visualización de los productos de amplificación en geles de poliacrilamida al 15% teñidos con nitrato de plata..... 29
Figura 4	Visualización de los productos de amplificación marcados con IRD800 en geles de poliacrilamida al 6.5% en el secuenciador..... 30
Figura 5	Dendrograma de agrupamiento de las cepas de <i>Frankia</i> con base en el algoritmo Neighbor Joining y su origen geográfico..... 31
Figura 6	Dendrograma de agrupamiento de las cepas de <i>Frankia</i> con base en el algoritmo Neighbor Joining y su HSG..... 32
Figura 7	Dendrograma de agrupamiento de las cepas de <i>Frankia</i> con base en el algoritmo UPGMA y su origen geográfico..... 33
Figura 8	Dendrograma de agrupamiento de las cepas de <i>Frankia</i> con base en el algoritmo UPGMA y el HSG al que pertenecen..... 34

DIVERSIDAD GENÓMICA DE CEPAS DE *Frankia* DE DIFERENTES ORÍGENES Y HOSPEDEROS MEDIANTE POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Frankia es un microorganismo simbiótico fijador de nitrógeno asociado con algunas angiospermas denominadas plantas actinorrícicas. Estas plantas son capaces de crecer en suelos marginales en buena medida gracias a esta interacción simbiótica. En el presente trabajo se estudió la diversidad genómica de 18 cepas de *Frankia* de diferentes zonas geográficas y plantas hospedantes mediante el análisis de los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), herramienta molecular que ha demostrado ser valiosa en el análisis genómico de microorganismos. Se observó gran diversidad genética entre las diferentes cepas con base en el origen geográfico y el grupo de especificidad de hospedero (HSG); la mayor diversidad se encontró al interior de los grupos, pero no entre ellos. Así mismo, se establecieron diferencias entre las cepas aisladas de *Myrica*, que anteriormente habían sido consideradas como promiscuas. Las cepas procedentes de hospedantes de la familia Myricaceae están más relacionadas con aquellas cepas del HSG 3 que con las pertenecientes al HSG 1, grupo en el que habían sido anteriormente asignadas con base en el estudio del gen 16S rDNA. Existió relación cercana entre cepas aisladas del mismo género de plantas actinorrícicas, aunque hubo diferencias entre los resultados de este estudio y los reportados con base en el análisis de las secuencias del gen 16S rDNA, ya que la variabilidad al interior del género fue mayor a los cuatro grupos formados bajo ese criterio. El género *Frankia* es poco divergente, por lo que la variabilidad observada no fue lo suficientemente importante como para proponer especies en el género.

**GENOMIC DIVERSITY OF *Frankia* STRAINS FROM DIFFERENT HOST PLANTS
AND GEOGRAPHICAL ORIGINS BY AMPLIFIED DRAGMENT LENGTH
POLYMORPHISM (AFLP)**

Frankia is a nitrogen-fixing symbiotic actinomycete associated to some angiosperms denominated actinorhizal plants. These plants are able to grow in marginal soils mostly due to this interaction. We studied the diversity of 18 *Frankia* strains from different geographic origins and host specificity groups (HSG) by AFLPs, a molecular tool that has shown to be very valuable for genomic analysis of microorganisms. A great diversity was found among strains, and the greater diversity was found within the populations, instead of between them. In addition, the strains nodulating the family Myricaceae are genetically different, and they are more related to strains from the HSG 3 instead of HSG 1, where they were located according to 16S rDNA studies. The strains isolated from a same genus of actinorhizal plants were related, but there were differences between our results compared to previous reports based on the 16S rDNA sequences, because the variability within the genus was greater than the four groups reported on basis of this criterion. There was low divergence inside the genus *Frankia*, so the variability showed was not enough to propose new species.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo está enfocado al estudio de la diversidad genómica de aislamientos de *Frankia* de diferentes zonas geográficas mediante el análisis de los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), herramienta molecular que ha demostrado ser valiosa en el análisis genómico de microorganismos (Savelkoul *et al.*, 1999). *Frankia* es un microorganismo capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de algunas angiospermas, las cuales son denominadas Plantas Actinorrícicas. En buena parte, dichas plantas son capaces de crecer en suelos devastados y empobrecidos debido a esta interacción simbiótica (Valdés, 2003).

El estudio de la genética de *Frankia* comenzó con base en su similitud con otras bacterias fijadoras de nitrógeno, tales como *Rhizobium spp.*, por medio de hibridaciones heterólogas, lo que ha dado lugar a la descripción de genes muy importantes, la mayoría de ellos involucrados con la fijación de nitrógeno y en el proceso simbiótico. Asimismo los espacios intergénicos de los genes ribosomales y de los genes de la nitrogenasa *nifHDK* de *Frankia* han sido ampliamente estudiados en virtud de que al ser regiones no codificantes, no están bajo presión de selección y la variabilidad de esas regiones es mantenida bajo los agentes evolutivos de mutación y deriva. La presencia de los genes *nif* se considera un rasgo diagnóstico del género *Frankia* y, basados en las secuencias obtenidas, se han diseñado algunos iniciadores *Frankia*-específicos para detectar este gen por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Simonet *et al.*, 1991; Normand y Bousquet, 1989).

Al interior del género *Frankia* no ha sido posible denominar especies, y el análisis de un número significativo de secuencias del gen 16S rDNA demostró que dentro del genero *Frankia* existen cuatro grupos (Normand *et al.*, 1996), clasificación actualizada posteriormente al incluir cepas procedentes de nódulos de plantas de la familia Rhamnaceae (Clawson *et al.*, 1998):

Grupo 1: cepas infectivas en los géneros *Myrica*, *Alnus*, *Casuarina* y *Allocasuarina* .

Grupo 2: cepas no cultivables presentes en nódulos de plantas de las familias Rosaceae, Coriariaceae, Datisceae y el género *Ceanothus*.

Grupo 3: cepas de las familias Elaeagnaceae, Rhamnaceae y el género *Gymnostoma*.

Grupo 4: cepas aisladas de nódulos de diversas especies de plantas que nodulan (pero son *nif*-) excepto del género *Alnus*.

Sin embargo, a nivel genómico, en *Frankia* los estudios se han enfocado principalmente en homología DNA-DNA y electroforesis en gel en campos pulsados (PFGE) (Hann, 2004), así como RAPD, ERIC, rep-PCR (Valdés *et al.*, 2001). Y, en la actualidad, las técnicas moleculares han ido evolucionando y el análisis AFLP ha mostrado resultados interesantes en estudios a nivel genómico de microorganismos (Savelkoul *et al.*, 1999). Esta técnica tiene un poder de discriminación muy parecido a otras técnicas moleculares, tales como el estudio de los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), (PFGE), rep-PCR y el perfil proteínico celular completo; pero los AFLPs presentan características más deseables de reproducibilidad y solidez, dado que existe la posibilidad de utilizar temperaturas astringentes de alineamiento de la PCR y no depende de hibridación, digestión parcial o patrones débiles (Savelkoul *et al.*, 1999).

En virtud de la perspectiva que ofrece actualmente esta técnica y los excelentes resultados que ha demostrado en estudios realizados en una amplia gama de microorganismos, se propone analizar la diversidad genómica de diferentes cepas de *Frankia* por AFLPs con el fin de caracterizarlas molecularmente y contribuir en el conocimiento del genoma de esta bacteria filamentosa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno

En la mayoría de los ecosistemas terrestres, los factores limitantes para el crecimiento de las plantas son los bajos contenidos en el suelo de compuestos como el nitrógeno (N), fósforo (P) o potasio (K). Mientras que las plantas verdes son capaces de obtener C por medio de la fotosíntesis, el N y P deben ser tomados del suelo. El nitrógeno es asimilable por las plantas en forma de iones amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-). Estos compuestos nitrogenados son reciclados por microorganismos a partir de compuestos orgánicos y, en la mayoría de los casos, el ciclo del nitrógeno en el suelo es suficiente para mantener el crecimiento de las plantas. Sin embargo, en algunos ecosistemas la disponibilidad del nitrógeno es limitada. Esto puede ocurrir en suelos primarios (áreas de dunas, sitios de actividad volcánica reciente), pero también puede ser causado por la erosión del suelo, condiciones ácidas o de privación de oxígeno (mineralización de N_2 reducida) y la explotación por parte del hombre (deforestación, sobre explotación de tierras para cultivo). Algunas bacterias de vida libre de diferentes géneros como *Azotobacter* o *Klebsiella* y cianobacterias como las pertenecientes al género *Nostoc* y *Anabaena* tienen la capacidad de transformar el N_2 atmosférico en nitrógeno orgánico en forma de amonio. El impacto de estas bacterias de vida libre en el nitrógeno total del suelo en general es modesto, dado el requerimiento de energía, pero a largo plazo contribuyen al enriquecimiento del suelo. Alternativamente, las bacterias fijadoras de N_2 que establecen simbiosis con plantas superiores tienen mejores oportunidades de desarrollo dado que obtienen de las plantas hospederas el suplemento de C. Estas asociaciones simbióticas consisten en bacterias específicas fijadoras de N_2 y las plantas que contienen a estas bacterias en tejidos especializados, la mayoría en las raíces o cerca de ellas (Wolters, 1998), y las más conocidas son las conformadas por las plantas leguminosas y *Rhizobium*, *Nostoc* con musgos y hepáticas, *Anabaena* con *Azolla* y la simbiosis actinorrhiza, con la bacteria filamentosa *Frankia*.

2.2 Plantas actinorrícicas

Las angiospermas o plantas con flor, son en la actualidad las plantas más exitosas en la tierra y sobrepasan en importancia a cualquier gimnosperma (como los pinos y abetos), se han adaptado a casi cualquier hábitat y son las dominantes en la tierra, con más de 250,000 especies (Viljee *et al.*, 1992). Las plantas actinorrícicas son angiospermas, y se encuadran en 25 géneros distribuidos en 8 familias: Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datisceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae y Rosaceae (Benson y Silvester, 1993); habitan muy diversos ecosistemas y se adaptan a condiciones ambientales extremas como son los suelos salinos, terrenos pantanosos y ambientes polares. Todas estas plantas tienen en común que son de crecimiento rápido y además poseen gran capacidad de crecimiento en suelos con baja fertilidad o después de algún disturbio (como erupciones volcánicas o incendios) y son frecuentemente las pioneras en el desarrollo de la sucesión de la comunidad vegetal. “Esta habilidad es incuestionablemente debida a la actividad fijadora de N₂ inducida por la simbiosis mutualista con el actinomiceto *Frankia*” (Valdés, 2003). Las plantas actinorrícicas son útiles para la reforestación y recuperación de suelos marginales. Por esta razón, en los países en vías de desarrollo las simbiosis actinorrícicas tienen un gran potencial de uso en silvicultura y agrosilvicultura.

El uso de plantas actinorrícicas es importante para la solución de problemáticas relacionadas con la deforestación causada por la falta de combustible o forraje, ya que al ser árboles de rápido crecimiento, fijadores de N₂ y que no necesitan de fertilizantes, representan una alternativa para cubrir este tipo de necesidades. Además, tienen la capacidad de colonizar suelos erosionados y restaurarlos en suelos productivos. Esta propiedad se debe en buena parte a la asociación simbiótica que establecen con el actinomiceto *Frankia* (Valdés, 2003). La mayoría de estas plantas son especies perennes leñosas que pueden ser encontradas en la mayoría de las zonas climáticas. En Europa y Asia los géneros más importantes son *Alnus*, *Hippophaë*, *Myrica* y *Elaeagnus*. En zonas árticas *Alnus* y *Dryas* son géneros importantes, involucrados en la colonización de tierras glaciales. En regiones tropicales y subtropicales (Asia, Australia) el género más común es *Casuarina* (Valdés, 2003).

La variedad de las plantas actinorrícicas es considerable, pero la diversidad en *Frankia* apenas empieza a ser entendida. Los beneficios de esta simbiosis *Frankia*-Actinorriza se conocen desde hace años y desde 1898 se describió la naturaleza simbiótica de esta bacteria en los nódulos de *Alnus glutinosa* (Swensen y Benson, 2003). En 1978, el grupo del Dr. Torrey de la Universidad de Harvard (Callaham *et al*, 1978), logró aislar y hacer cultivos puros del actinomiceto *Frankia*.

2.3 El género *Frankia*

El nombre de *Frankia* como género fue propuesto por Becking (1970) en honor del microbiólogo suizo A. B. Frank, quien acuñó el término simbiosis. Los intentos iniciales para caracterizar taxonómicamente a este microsimbionte lo describieron como una bacteria simbiótica obligada y usaron su capacidad para formar nódulos, además de sus características morfológicas como la formación de filamentos y vesículas en las células de estos nódulos como criterio discriminativo respecto a otros actinomicetos. Este criterio dio lugar a la formación de la familia *Frankiaceae* con el género tipo *Frankia* (Becking, 1970). Se propusieron 10 especies dentro del género *Frankia* con base en la formación de grupos de infección específicos de plantas hospederas después de la inoculación con nódulos triturados (Becking, 1970). Investigaciones posteriores con cultivos puros demostraron que los grupos de infectividad de hospederos eran diferentes (Normand y Lalonde, 1986; Baker, 1987).

2.4 Aislamiento de *Frankia*

El primer aislamiento exitoso de *Frankia* fue llevado a cabo hace 26 años (Callaham *et al*, 1978). A partir de eso se han logrado obtener cientos de aislamientos a partir de nódulos usando diferentes técnicas de aislamiento. Sin embargo, no se ha podido desarrollar un protocolo general de aislamiento y sólo un pequeño porcentaje de los miles de intentos de

aislamiento resulta exitoso (Rosbrook *et al.*, 1989). Sólo una vez se ha reportado un aislamiento exitoso del segundo nicho ecológico de la bacteria, el suelo (Baker y O'Keefe, 1984).

Los problemas en el aislamiento de *Frankia* han sido atribuidos a sus largos tiempos de generación, el requerimiento de factores de aislamiento especiales (Quispel *et al.*, 1989), la carencia de requerimientos nutricionales específicos de los cultivos obtenidos a la fecha (Akkermans *et al.*, 1991) y la gran variabilidad de aislamientos combinados en el género *Frankia* (Akimov y Dobritsa, 1992; Fernández *et al.*, 1989; Lechevalier, 1994). El aislamiento y el cultivo son prerequisites para la caracterización de *Frankia* por técnicas tradicionales enfocadas en el análisis de los patrones de proteínas e isoenzimas, susceptibilidad y resistencia a antibióticos, composición de azúcares y de ácidos grasos u otros criterios como la producción de pigmentos (Hann, 2003).

2.5 Morfología de los cultivos de *Frankia*

Muchos aislamientos de *Frankia* pueden ser distinguidos claramente de otros géneros de bacterias con base en características morfológicas, citoquímicas y fisiológicas (Baker, 1990). Las características morfológicas distintivas de los aislamientos incluyen el crecimiento filamentososo, la formación de esporangios multilocus que contienen esporas no móviles, y la diferenciación de estructuras vesiculares de pared gruesa en las puntas de los filamentos, que es donde se localiza la nitrogenasa y, por tanto, la fijación de nitrógeno (Figura 1a) (Lechevalier, 1994). Las células están caracterizadas por una pared celular tipo III que contiene ácido meso-diaminopimélico, ácido glutámico, alanina, glucosamina y ácido murámico, fosfolípidos tipo PI con fosfatidil inositol, manósidos de fosfatidil inositol y difosfatidiglicerol, así como 2-O-metil manosa como azúcar distintivo (Lechevalier, 1994). Las propiedades fisiológicas más prominentes de *Frankia* son su capacidad para inducir la formación de nódulos radiculares en plantas hospederas específicas (Figura 1b), así como la capacidad de fijar nitrógeno molecular cuando sus concentraciones son limitadas, incluso en cultivos *in vitro* (Lechevalier, 1994).

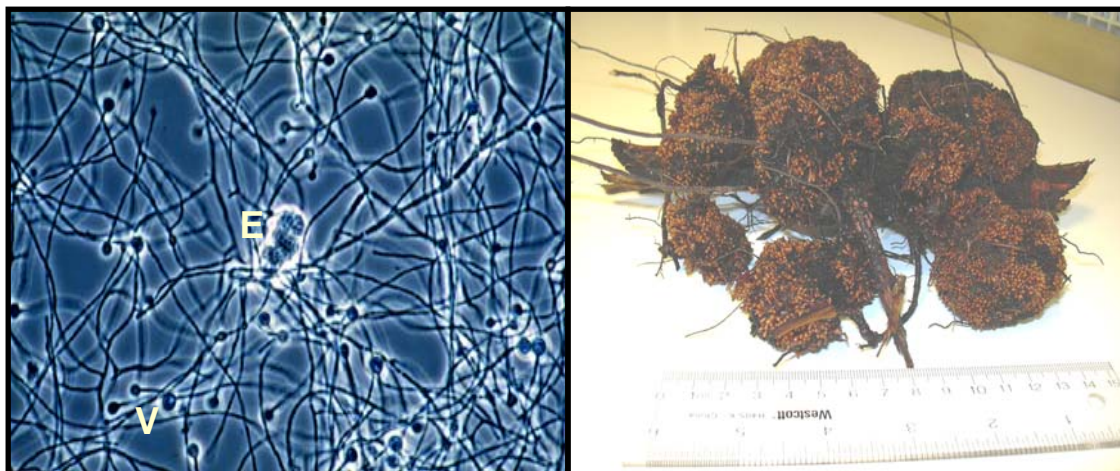


Figura 1. Morfología de *Frankia*. a) Morfología característica de los cultivos puros de *Frankia*. Puede verse el micelio conformado por hifas cenocíticas, esporangio (E), vesículas (V) (izquierda). b) Nódulos radiculares inducidos por el actinomiceto *Frankia* en las raíces de *Casuarina equisetifolia*, una de sus plantas hospedantes.

Esta combinación de características fenotípicas ha demostrado ser frecuentemente útil para la identificación de *Frankia*. Aunque algunas características pueden ser compartidas por otros microorganismos, como la multiplicación celular en más de un plano, en lo que se asemeja a actinomicetos como *Geodermatophilus obscurus* y *Dermatophilus congolensis*, pero puede diferenciarse de éstos por la formación de esporangios multilocus. Sin embargo, la expresión y la presencia de las características fenotípicas de *Frankia* pueden variar respecto al aislamiento y a las condiciones de cultivo. Por ejemplo, la formación de esporangios varía entre diferentes aislamientos y puede estar completamente suprimida bajo algunas condiciones de cultivo. Bajo las mismas condiciones de cultivo, un aislamiento puede mostrar esporangios terminales, otros muestran esporangios intercalados y algunos otros carecen de ellos por completo. Las vesículas, los sitios de fijación de N_2 , generalmente se forman bajo condiciones de privación de este elemento, pero pueden estar presentes en presencia de una fuente de nitrógeno, aunque inactivas. Sin embargo, además de las típicas *Frankia* diazotróficas, se han obtenido algunos aislamientos atípicos no fijadores de nitrógeno en nódulos de plantas actinorrícicas. Estos

aislamientos producen hifas y esporangios terminales, pero son incapaces de producir vesículas en cultivos puros y en nódulos, por lo que son incapaces de crecer en ausencia de una fuente de nitrógeno (Hann *et al.*, 1988).

2.6 Clasificación taxonómica de *Frankia*

El estudio de *Frankia* comenzó con su comparación con otras bacterias simbióticas como *Rhizobium*. Según la taxonomía tradicional de *Rhizobium* de esa época, Becking creó 10 especies de *Frankia* de acuerdo con su especificidad para nodular plantas. Años más tarde, se hizo un estudio extensivo que originó una nueva clasificación respecto con su capacidad de formar nódulos en hospederos específicos (Baker, 1987). Esta clasificación dió lugar a la formación de cuatro grupos de infectividad de hospedero que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Grupos de infectividad de hospedero de *Frankia* (Baker, 1987).

GRUPOS DE INFECTIVIDAD DE HOSPEDERO	
Grupo 1	Cepas nodulantes en <i>Alnus</i> y <i>Myrica</i>
Grupo 2	Cepas nodulantes en <i>Casuarina</i> y <i>Myrica</i>
Grupo 3	Cepas nodulantes en <i>Myrica</i> y <i>Elaeagnus</i>
Grupo 4	Cepas que nodulan miembros de la familia Elaeagnaceae (<i>Elaeagnus</i> , <i>Hippophaë</i> , <i>Shepherdia</i>).

Sin embargo, esta clasificación fué incompleta, ya que no incluye aislamientos provenientes de algunos taxones de plantas actinorrícicas (como *Coriaria* y *Datisca*). Además, algunos aislamientos cruzan los límites entre grupos de infectividad de hospedero (Bosco *et al.*, 1992), mientras que otros muestran compatibilidad variable con especies de plantas del mismo género (Hann *et al.*, 1988; Huss-Danell y Myrold, 1994; Weber, 1990).

Al género *Frankia* se han aplicado diferentes herramientas para su caracterización y diferenciación, tales como el estudio de sus plásmidos, genes *nif*, regiones intergénicas, genes de la glutamín sintetasa (*gln*), el gen *recA* y los RNAs ribosomales (Hann, 2003). Lo que ha sido más aceptado en los últimos años, son los resultados obtenidos a partir del análisis de un número significativo de secuencias del gen 16S rDNA. Gracias a los resultados de estos estudios se formaron cuatro grupos al interior del género *Frankia*, denominados grupos de especificidad de hospedero (HSG, por sus siglas en inglés), clasificación que fue actualizada posteriormente al incluir cepas procedentes de nódulos de plantas de la familia Rhamnaceae (Clawson *et al.*, 1998), y se muestra en el Cuadro 2 (Normand *et al.*, 1996).

Cuadro 2. Grupos de *Frankia* formados con base en el análisis de la secuencia del gen 16S (Normand *et al.*, 1996, * Clawson *et al.*, 1998).

GRUPOS DE ESPECIFICIDAD DE HOSPEDERO (HSG)	
Grupo 1	Cepas infectivas en <i>Myrica</i> , <i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> y <i>Allocasuarina</i>
Grupo 2	Cepas no cultivables presentes en nódulos de Rosaceae, Coriariaceae, Datisceae y el género <i>Ceanothus</i> (*)
Grupo 3	Cepas aisladas de plantas de las familias Elaeagnaceae, Rhamnaceae (*) y el género <i>Gymnostoma</i>
Grupo 4	Cepas aisladas de nódulos de diversas plantas que nodulan (pero son <i>nif</i> -) excepto <i>Alnus</i>

En años más recientes, se han hecho numerosos estudios de homología DNA-DNA, y existen a la fecha datos de cerca de 80 cepas, donde destacan los estudios hechos por Fernández *et al* (1989) y Akimov y Dobritsa (1992). Con esta herramienta se ha demostrado que existe enorme diversidad dentro del género que va más allá de los 4 grupos de especificidad de hospedero. Estos estudios han llevado a la formación de más de 11 especies

genómicas. Desgraciadamente, la mayoría de estos datos provienen de estudios aislados, lo que hace difícil su comparación para hacer una clasificación mas robusta (Hann, 2003).

Los avances mas prominentes en estudios de taxonomía del género *Frankia* han resultado de la aplicación de taxonomía polifásica. La taxonomía polifásica integra información fenotípica, genotípica y filogenética brindada por un grupo relativamente grande de técnicas con diferente poder de resolución. Los métodos que brindan información fenotípica comprenden todos aquellos métodos que no tienen como objetivo el estudio del DNA o del RNA e incluyen técnicas quimiotaxonómicas. En cuanto a técnicas moleculares pueden tomarse en cuenta el análisis de la composición del DNA (porcentaje de G+C), estudios de reasociación, o técnicas de huella genómica tales como ribotipificación, Análisis de Fragmentos de Restricción de Baja Frecuencia (LFRFA), electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), así como las técnicas que tienen como "blanco" una parte del genoma y que son aquellas que han podido desarrollarse gracias a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Aquí se pueden incluir al análisis de amplificaciones al azar de DNA polimórficas (RAPD), huella genómica con blanco en secuencias palindrómicas repetidas (rep-PCR) (Valdés *et al.*, 2001), PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR), análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA). La introducción de la PCR ha abierto la posibilidad de caracterizar organismos no cultivables (Hann, 2003).

2.7 Impacto de las herramientas moleculares en la sistemática bacteriana

El comité para la reevaluación de la definición de las especies en bacteriología emitió un reporte en el año 2002 en el que se hicieron varias recomendaciones (Stackebrandt *et al.*, 2002), debido a que a partir de 1987 la introducción de métodos innovadores ha provisto nuevas oportunidades para la sistemática de procariotes. Algunas recomendaciones de particular interés incluyen: En el ordenamiento taxonómico de los taxones procariotes a nivel de género y reino ha sido reemplazado el estudio del 16S rRNA por el análisis de las secuencias del 16S rDNA; la determinación de similitud inter e intraespecies ha sido facilitada

por métodos rápidos de genotipificación, aquellos que tienen como objetivo el análisis del genoma en su totalidad (AFLP, RAPD, rep-PCR, PFGE), así como el análisis de grupos de genes (ribotipificación de operones *rrn*), genes individuales (ARDRA o 16S rDNA), y espacios intergénicos del operón de DNA ribosomal (Stackebrandt *et al.*, 2002). Como se menciona a continuación, el AFLP tiene ventajas sobre otras técnicas de análisis genómico, y esta poderosa herramienta no ha sido aplicada al género *Frankia*.

2.8 Principio del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP)

El análisis AFLP pertenece a la categoría de técnicas de amplificación selectiva de los fragmentos de restricción (Vanechoute, 1996) que están basadas en la ligación de adaptadores a fragmentos genómicos de restricción seguida de una amplificación basada en la PCR con iniciadores específicos para los adaptadores. Los patrones obtenidos de diferentes cepas son polimórficos debido a: 1) mutaciones en los sitios de restricción, 2) mutaciones en las secuencias adyacentes a los sitios de restricción y complementarias a las extensiones selectivas de los iniciadores, y 3) mutaciones por inserciones o deleciones dentro de los fragmentos amplificados. Además, se ha demostrado que para genomas pequeños (bacterias u hongos filamentosos) es suficiente una amplificación por PCR con uno o dos nucleótidos selectivos en ambos iniciadores, respectivamente.

2.9 Comparación del análisis por AFLP con otras técnicas

El rendimiento del análisis por AFLP se compara con otras técnicas respecto a cuatro criterios: reproducibilidad y solidez, poder de discriminación, tipificación y aspectos operativos.

2.9.1 Reproducibilidad y solidez

Dado que las cantidades de DNA digerido son pequeñas y la detección de fragmentos de AFLP no depende de hibridación, digestión parcial ó patrones débiles, que son fuentes de irreproducibilidad en genotipificación por análisis tipo RFLP, puede decirse que esta técnica es altamente reproducible. Además, la posibilidad de utilizar temperaturas astringentes de alineamiento de PCR hace que el análisis AFLP sea un método mas reproducible y robusto que el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD). La mayor fuente de ambigüedades en la comparación de patrones de AFLP reside en la variación en la intensidad de los fragmentos amplificados, que es probablemente debida a diferencias en la eficiencia de la PCR. Como consecuencia, la detección de fragmentos menores puede depender del nivel de detección y la cantidad de DNA analizado (Savelkoul *et al.*, 1999).

2.9.2 Poder de discriminación

Los métodos de genotipificación difieren en su poder de discriminación, dependiendo del nivel taxonómico y categoría. En bacteriología, la discriminación a nivel de especies es referida mas frecuentemente como identificación, mientras que la tipificación denota diferenciación a nivel de cepas. El análisis de AFLP puede ser utilizado tanto para identificación como para tipificación. El análisis AFLP no es informativo a los niveles taxonómicos de género o familia, debido a que con una similitud menor al 40% solo se comparten algunas bandas y pueden agruparse especies no relacionadas. Para bacterias el análisis AFLP parece tener el mismo rango taxonómico que otras técnicas de huella genética como análisis de RAPD, electroforesis de campos pulsados (PFGE), análisis RFLP, PCR basado en secuencias repetitivas de DNA (rep-PCR) y perfil de proteínas. Este tipo de estudios, al igual que el AFLP, determinan diferencias a nivel de especie, subespecie y cepa.

Algunos estudios han demostrado que el análisis AFLP es más informativo que los otros métodos, ya que éstos no delimitan correctamente las especies genómicas; además, algunas cepas pertenecientes a la misma especie no pueden ser diferenciadas entre ellas.

Los AFLPs combinan algunas ventajas de estas diferentes técnicas, que en la mayoría de los casos resulta en un mayor nivel de discriminación. Al igual que los RFLP, RAPD, PFGE y rep-PCR, pero a diferencia del análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA), los AFLPs corresponden a mutaciones que están dispersas a lo largo del genoma. Al igual que PFGE, RFLP y ARDRA, la variación en AFLP está basada en mutaciones en sitios de restricción o en diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción, pero el análisis de AFLP también explota la variación en los nucleótidos que se aparean con los extremos 3' selectivos. Lo más importante es que el método AFLP produce más fragmentos que otras técnicas de huella genética (Savelkoul *et al.*, 1999).

Los métodos de rep-PCR explotan la variación de los sitios de inserción de elementos repetidos en el genoma. Para bacterias Gram (-) y Gram (+) son universales los elementos ERIC, REP y BOX. Una comparación detallada de la hibridación del DNA con el análisis AFLP, así como rep-PCR en *Xanthomonas* (Janssen *et al.*, 1996) mostró que los agrupamientos basados en hibridación DNA-DNA fueron igual a los producidos mediante AFLPs, mientras que el análisis tipo ERIC PCR reveló mayor variedad de cepas dentro de los grupos. Además, la clara correlación entre la hibridación DNA-DNA genómico y los coeficientes similares de AFLPs y rep-PCR no dependen del modelo estadístico, sistema de clasificación o de métodos de calificación. Esto sugiere que el análisis AFLP y otros métodos de huella genética pueden funcionar como técnicas clave en un sistema taxonómico polifásico, complementando métodos basados en homología DNA-DNA (Savelkoul *et al.*, 1999).

2.9.3 Tipificación

Una característica única del análisis AFLP es que puede ser adaptado al DNA de cualquier organismo mediante el uso de nucleótidos selectivos. Una limitación básica del análisis AFLP (y de otros procedimientos de tipificación genómica) es que el organismo a ser tipificado tiene

que estar en cultivo puro, debido a que el DNA de otras fuentes puede modificar el patrón AFLP (Savelkoul *et al.*, 1999).

2.9.4 Aspectos operativos

Como el análisis de AFLP es un ensayo basado en la PCR, se requiere solo una pequeña cantidad de DNA. El DNA tiene que ser puro y de doble cadena, pero su concentración exacta parece ser menos crítica. Los oligonucleótidos adaptadores pueden adquirirse comercialmente. Las subsecuentes digestiones, ligaciones, amplificaciones y análisis en gel de poliacrilamida son relativamente largos, pero con los iniciadores fluorescentes y el análisis en secuenciadores automáticos, los análisis pueden hacerse en 24 h. El análisis en secuenciadores automáticos con software para analizar los patrones de bandas, informativos pero complejos, permite una compilación automática de una base de datos la cual puede compararse a patrones de referencia. La reproducibilidad es tan alta que permite comparar patrones de aislados posteriores o previos, o incluso patrones obtenidos por otros laboratorios (Savelkoul *et al.*, 1999).

2.10 Aplicaciones del AFLP en bacteriología

Janssen *et al.* (1996) fueron pioneros en el análisis de genomas bacterianos por AFLP y optimizaron las condiciones experimentales para 147 cepas de nueve especies bacterianas distintas, además de presentar el análisis computacional de los datos. Se evaluaron los efectos de diferentes enzimas de restricción y extensiones selectivas de los iniciadores sobre el poder discriminatorio del análisis AFLP sobre diferentes especies. Los resultados mostraron evidencia del potencial del análisis AFLP en estudios epidemiológicos y evolutivos. Desde entonces, algunos investigadores han reportado la aplicación del análisis AFLP en genética bacteriana.

2.10.1 Taxonomía

Uno de los primeros géneros extensivamente estudiados por análisis AFLP fue *Aeromonas* (Huys *et al.*, 1993), donde se estudiaron 125 cepas de *Aeromonas* correspondientes a un solo grupo de hibridación DNA-DNA. El análisis por AFLP permitió diferenciar a las cepas dentro de este grupo. El análisis AFLP de 98 cepas de *Aeromonas* representantes de los 14 grupos de hibridación, así como cuatro especies no incluidas aún en un grupo de hibridación, reveló que dicho análisis tiene fuerte correlación con la hibridación de DNA, que aún es considerada como “estándar de oro” (Esteve, 1997, Huys *et al.*, 1996 y Wayne *et al.*, 1996). En un estudio taxonómico de *Paenibacillus*, patógeno de la abeja, el análisis AFLP combinado con métodos bioquímicos y tipificación del DNA dió como resultado la reclasificación del género. Se mostró que pese a existir una relación del DNA de 90%, el análisis AFLP pudo distinguir las cepas a nivel de subespecie (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Los estudios descritos muestran que el análisis AFLP es un método poderoso para la delineación de grupos genómicos dentro de un género o una especie.

2.10.2 Epidemiología

Dentro del estudio de la distribución y persistencia de bacterias patógenas de importancia médica, la huella genética ha tomado un papel importante desde hace una década aproximadamente (Tenover *et al.*, 1994; Van Belkum, 1994), y el estudio con AFLPs ha tenido un impacto muy favorable dentro de este rubro.

Valsangiacomo *et al.* (1995) analizó aislamientos de *Legionella pneumophila* provenientes tanto de pacientes como de diferentes fuentes de agua mediante AFLPs, RFLPs y ribotipificación. El origen de la infección fue identificado por el análisis AFLP, dado que los patrones de las muestras clínicas y las muestras ambientales no relacionadas mostraron ser claramente diferentes. De la misma manera, ésta técnica fue aplicada al género *Arcobacter*, con el fin de evaluar su eficiencia para el análisis taxonómico y epidemiológico de diferentes

especies del género. El perfil AFLP es una manera eficiente para determinar relaciones entre las cepas y taxonomía dentro del género. El impacto del estudio se enfoca a la evidencia de la clonalidad en *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, así como la identificación potencial de un nuevo taxón de *Arcobacter*. Así mismo, fue el primer reporte de la aplicación de esta técnica en el género (On *et al.*, 2003). En *Vibrio cholerae* fue empleado el poder resolutivo del análisis AFLP para determinar las relaciones evolutivas y la diversidad molecular de cepas aisladas de medios acuáticos de Bangladesh, Sudamérica, el sureste de Asia y África durante las últimas dos décadas para poder entender las fuentes, orígenes y epidemiología del microorganismo. Los resultados revelaron que a pesar de que una sola clona de *V. cholerae* parece ser responsable de muchos casos de cólera en Asia, África y Latinoamérica durante la pandemia de la década de los 70s, otros casos clínicos de cólera pudieron haber sido causados por cepas derivadas o no de ésta (Jiang *et al.*, 2000). Así mismo, se evaluó el método AFLP para análisis epidemiológico y filogenético de aislamientos de *Klebsiella*. Las dos especies clínica y epidemiológicamente más importantes del género son *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* se habían dividido en tres y dos grupos filogenéticos, respectivamente (Brisse y Verhoef, 2001). Se compararon los patrones AFLP de aislamientos obtenidos de diferentes focos de infección y de cepas representativas ampliamente caracterizadas filogenéticamente. El estudio demostró que los AFLPs fueron efectivos para diferenciar aislamientos no relacionados epidemiológicamente y confirmaron la separación clara de los grupos filogenéticos recientemente identificados y, finalmente, demuestra que el análisis AFLP es aplicable para la identificación de especies y grupos filogenéticos de *Klebsiella* (Jonas *et al.*, 2004).

2.10.3 Ecología

En un estudio extensivo que se llevó a cabo en aislamientos de *Aeromonas* provenientes de plantas de producción de agua potable (Huys *et al.*, 1996) se empleó una biblioteca de patrones AFLP que permitió determinar la distribución de diferentes aislamientos, la designación de una nueva especie dentro del género (*A. popoffii* sp. nov.) (Huys *et al.*, 1997) y posteriormente sugirió la persistencia de una clona genéticamente estable de *Aeromonas*

residente en los pozos de agua es Suecia durante los cuatro años del estudio (Kühn *et al*, 1997). En un estudio realizado para analizar la organización de la comunidad microbiana en un campo de trigo en Virginia, EUA se extrajo el DNA de la población total y su estructura fué comparada utilizando la técnica AFLP. La similitud relativa fue calculada entre cada par de muestras y comparada mediante análisis de variograma geoestadístico para estudiar la autocorrelación en función de la distancia de cada punto de muestreo. Los resultados muestran que la distribución bacteriana puede poseer variación multiescala, aún dentro de un hábitat que aparenta ser relativamente homogéneo en el campo (Franklin y Mills, 2003).

2.10.4 Otras aplicaciones

El análisis AFLP ha sido aplicado en estudios de genomas de hongos, parásitos, animales y, principalmente, plantas. En genomas vegetales el AFLP se aplica principalmente en estudios de filogenia y diversidad, identificación de variedades, manejo de germoplasma, selección indirecta de características agrónomicamente importantes y monitoreo de retrocruzas (Savelkoul, 1999).

También, se han hecho adaptaciones para ver diferencias en los patrones de metilación, análisis sistemático de la expresión genética diferencial (utilizando el cDNA) y, además, los productos AFLP pueden ser recuperados, clonados y secuenciados para identificar marcadores genéticos (Savelkoul, 1999).

Con base los estudios aquí descritos, puede decirse que el análisis AFLP es un método importante para delimitar especies genómicas. Además, el análisis AFLP provee de una visión detallada de la estructura específica de una amplia gama de microorganismos que a la fecha han sido estudiados por dicha técnica, por lo que puede ser útil en la confirmación epidemiológica de cepas, en estudios ecológicos, taxonómicos, de diversidad, etc.

3. JUSTIFICACIÓN

A la fecha, se han reportado numerosos estudios fisiológicos y moleculares con el fin de esclarecer la estructura del género *Frankia*; sin embargo, éstos no han sido suficientes para establecer de forma definitiva su organización. Uno de los principales logros ha sido que con base en las secuencias del gen 16S ribosomal y al hospedante con quien se relacionan, ha sido posible agrupar al género *Frankia* en cuatro grupos, sean o no cultivables. Todo esto deja entrever que el hospedante de origen es importante, pero no determinante para la designación de especies. Se ha demostrado incluso que existe una alta diversidad entre aislamientos de una misma planta actinorrícica, lo cual ha hecho más complicada la asignación de especies y aún se está tratando de establecer los criterios para la asignación de especies dentro del género *Frankia*. Actualmente, las herramientas moleculares, particularmente aquellas que consideran el análisis del genoma, han avanzado sustancialmente, desarrollándose técnicas como el AFLP, que ha demostrado ser muy útil en estudios de diversidad bacteriana y ha sido de gran ayuda en la definición de la taxonomía de diferentes géneros. Por lo anterior se propone que el AFLP es una buena opción para explorar a nivel genómico la diversidad de las cepas de *Frankia* con orígenes y hospedantes distintos, con el propósito de contribuir a su ordenamiento filogenético y taxonómico.

4. OBJETIVO GENERAL

Generar información genómica a partir de aislamientos del género *Frankia* que contribuya al conocimiento de su filogenia y a su ordenamiento taxonómico.

4.1 Objetivos particulares

- Agrupar cepas de *Frankia* con base en sus patrones AFLP y determinar las relaciones filogenéticas entre las mismas.
- Analizar comparativamente los resultados obtenidos con la información genética disponible de *Frankia*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Procedencia de los reactivos

Los reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivo de *Frankia* pertenecen a las casas comerciales SIGMA (St. Louis, MO, EUA), Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EUA) y Research Organics (Cleveland, OH, EUA). Para la extracción de DNA se utilizó el estuche “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de Promega Corporation (Madison, WI, EUA). Para las reacciones de AFLP se utilizaron los estuches “AFLP Analysis System for Microorganisms” y “AFLP Microorganism Primer Kit” de la casa comercial Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, EUA). Los oligonucleótidos marcados con fluorescencia para la amplificación selectiva fueron sintetizados por la empresa LI-COR, Inc. (Lincoln, NE, EUA), mientras que los iniciadores no marcados fueron sintetizados en Operon Technologies (Alameda, CA, EUA). La enzima *Taq* DNA polimerasa procedió de Promega Corporation (Madison, WI, EUA) así como el TEMED, y el persulfato de amonio de la empresa Research Organics (Cleveland, OH, EUA). La bis-acrilamida utilizada en los geles para tinción con plata procedió de la casa comercial BIORAD, y la utilizada en los geles para el secuenciador, de LICOR.

5.2 Cepas de *Frankia* y condiciones de cultivo

Se formó una colección de cepas de *Frankia* de diferentes regiones del mundo, de la cual se tomaron representantes procedentes de diferentes familias de plantas hospedantes y de diferentes regiones geográficas. Las cepas utilizadas en este estudio se incluyen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cepas de *Frankia* de diferentes orígenes geográficos y hospedantes incluidas en este estudio.

CEPA	HOSPEDANTE	HSG	ORIGEN GEOGRÁFICO	FUENTE C	REFERENCIA
ACN1	<i>Alnus crispa</i>	1	Canadá	Propionato de sodio + piruvato de sodio	L. S. Tisa, UNH
ACN14	<i>Alnus cordata</i>	1	Canadá	“	L. S. Tisa, UNH
Air11	<i>Alnus incana</i> spp. <i>rugosa</i>	1	Vermont, EUA	“	A. Berry, UC Davis
Ar13	<i>Alnus rubra</i>	1	Oregon, EUA	“	A. Berry, UC Davis
Avcl1	<i>Alnus viridis</i> spp. <i>crispa</i>	1	Ontario, Canadá	“	A. Berry, UC Davis
CeSI5	<i>Casuarina equisetifolia</i>	1	EUA	“	A. Berry, UC Davis
Ch11	<i>Colletia hystrix</i>	3	Chile	Glucosa	M. Carú, U. de Chile
CpIP	<i>Comptonia peregrina</i>	1	EUA	“	L. S. Tisa, UNH
EANIpec	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	3	Ohio, EUA	“	L. S. Tisa, UNH
Eu11b	<i>Elaeagnus umbellata</i>	3	Massachusetts, EUA	“	A. Berry, UC Davis
IPNCe20	<i>Casuarina equisetifolia</i>	1	Miraflores, Edo. de México, México	Propionato de sodio	M. Valdés, ENCB, IPN
M3	<i>Myrica cerifera</i>	1	El esquilon, Ver, México	“	M. Valdés, ENCB, IPN
Re16	<i>Retanilla ephedra</i>	3	Chile	Glucosa	M. Carú, U. de Chile
S14	<i>Shepherdia argentea</i>	3	Samara, Rusia	“	A. Berry, UC Davis
Tq15	<i>Talguenea quinauinervia</i>	3	Chile	“	M. Carú, U. de Chile
Tt11	<i>Trevoa trinervis</i>	3	Chile	“	A. Berry, UC Davis
Tt12	<i>Trevoa trinervis</i>	3	Chile	“	A. Berry, UC Davis
Tt142	<i>Trevoa trinervis</i>	3	Chile	“	M. Carú, . de Chile

5.2.1 Medios para propagación

El crecimiento de las cepas de *Frankia* se llevó a cabo en medio BAP, se probaron diferentes fuentes de carbono para las cepas y se observó el crecimiento óptimo con los compuestos indicados en el Cuadro 3. Se probaron condiciones estáticas y con agitación

magnético para lograr un aumento mas rápido de la biomasa y se encontró que las cepas aisladas de *Casuarina* y *Myrica* presentan mayor crecimiento en agitación mientras que las restantes aumentan su producción de micelio de una forma óptima en condiciones estáticas. La composición del medio se describe a continuación:

BAP mod

Medio base: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mM; CaCl_2 , 0.07 mM;

Fuente de Nitrógeno: NH_4Cl , 5.0 mM

Micronutrientes: H_3BO_5 , $2.86 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$; MnCl_2 , $1.81 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2.2 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $8 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $2.5 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$.

Vitaminas: Tiamina HCl, $1 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; Piridoxina HCl, $5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; Ácido nicotínico, $5 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; Ác. Fólico, $1 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; Biotina, $2.25 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; Riboflavina, $1 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$; Pantotenato de Calcio, $1 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$.

Amortiguador: Buffer de fosfatos, KH_2PO_4 1M, K_2HPO_4 1M, pH= 6.3, 10 mL L^{-1} . NaEDTA, 0.00784 g L^{-1} , Fe: trazas

Fuentes de Carbono: Propionato de sodio, 0.9606 g L^{-1} o Glucosa, 10 g L^{-1} o Propionato de sodio 0.48 g L^{-1} + Piruvato de sodio 0.55 g L^{-1} .

5.3 Extracción de DNA cromosomal

El DNA de *Frankia* fué extraído siguiendo el método descrito por la casa comercial distribuidora del estuche “Wizard Genomic DNA Purification Kit”, al cual se le hicieron algunas modificaciones. El protocolo final se describe a continuación:

Se transfirió a un tubo Eppendorf de 1 a 1.5 mL de cultivo. Se centrifugó 3 min a 13,000 rpm (Microcentrífuga Hermler modelo Z-160 MH). Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 mL de solución de acromopeptidasa 0.1 mg mL^{-1} y se agitó e incubó por 45 min a 37° C. Posteriormente se centrifugó 3 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 600 μL de *Nuclei Lysis Solution*® y se mezcló pipeteando suavemente. Luego se incubó por 15 min a 80° C en un Thermomixer (Eppendorf, modelo 2331). Se dejó enfriar a temperatura

ambiente para agregar de 2 a 3 μL de solución de RNasa. Se mezcló e incubó por 20 min a 37° C. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 200 μL de *Protein precipitation solution*®, se agitó en vortex (Daigger & Co., Inc, modelo G-560) y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó por 3 min a 13,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se agregó 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente mezclando vigorosamente y se incubó a -20° C por dos horas, o durante una noche preferentemente. Seguido a esto, se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 600 μL de etanol al 70 % a temperatura ambiente para lavar el precipitado de DNA y se mezcló por inversión. Luego, se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. El etanol se decantó y se secó el precipitado de DNA en centrífuga de vacío por 10 min. Finalmente, se rehidrató el DNA con 50 μL de *DNA Rehydration Solution*® y se incubó por 1 h a 65° C o toda la noche a temperatura ambiente.

5.4 Preparación del DNA molde para la amplificación por PCR

El DNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de agarosa). Se depositaron 5 μL de la muestra en el gel y se corrió en una cámara de electroforesis horizontal (Mini-Sub Cell GT, Bio-RAD) a 100 V por 40 min. Se observó el gel en el transiluminador con luz UV, captando la imagen del gel en el programa computacional Gel-Imagen de Kodak® Digital Science TM 1D. De esta manera se puede saber cuales muestras hay que diluir o concentrar para alcanzar uniformidad en las concentraciones del DNA de las diferentes cepas, pues se sugiere utilizar aproximadamente 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA genómico para realizar el análisis AFLP.

5.5 Reacciones de AFLP

La primera serie de ensayos se realizó con los estuches de reactivos AFLP Analysis System for Microorganisms® y AFLP Microorganism Primer Kit® (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la primera etapa de digestión del DNA en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, agregando 5 µL de buffer de reacción 5X, 2 µL de la mezcla de enzimas *EcoRI/MseI*, 13 µL agua destilada y 5 µL de DNA (250 ng). Se llevó a cabo la digestión a 37° C durante 16 h. Para llevar a cabo la ligación, se agregaron 24 µL de la solución de ligación-adaptador más 1 µL de la enzima ligasa y se incubó esta mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Para la primera amplificación por PCR se utilizaron tubos de PCR de 0.2 mL estériles, depositándose 5 µL del producto DNA de ligación, 40 µL de Pre-amp Primer mix II, 5 µL de 10X PCR buffer suplementado con Mg^{+2} y 0.2 µL de *Taq* DNA polimerasa (1 U). La reacción se llevó a cabo en el termociclador iCycler (BIORAD®) realizando 20 ciclos: desnaturalización a 94° C por 30 s, alineamiento a 56° C por 60 s y extensión a 72° C por 60 s. Este producto se diluyó al 50 % con agua miliQ estéril.

Se procedió a la segunda amplificación (selectiva) por PCR en tubos Eppendorf de 0.2 mL estériles, colocando 5 µL de DNA (producto diluido de la primera PCR), 2 µL 10X PCR buffer Plus Mg, 4.5 µL del iniciador 3' *MseI*, 0.5 µL iniciador 5' *EcoRI*, 0.1 µL de *Taq* DNA polimerasa, 7.9 µL de agua destilada. Se usó el termociclador iCycler (BIORAD®) realizando 13 ciclos donde la temperatura de alineamiento baja 0.7°C cada ciclo ("Touchdown") con temperaturas de 94° C por 30 s, 65° C por 30 s 72° C por 60 s; y 23 ciclos a 94° C por 30 s, 56° C por 30 s, 72°C por 60 s. Se probaron las combinaciones indicadas en el Cuadro 4, con el fin de hacer una preselección del tipo de iniciadores a utilizar y establecer las condiciones óptimas de la técnica.

En la segunda serie de ensayos las condiciones fueron iguales a las descritas, a excepción de que se utilizó 1 µL de los iniciadores *EcoRI* marcados con fluorescencia (IRD800) por reacción y se ajustó el volumen de agua para un volumen final de 20 µL. Se probaron las combinaciones indicadas en el Cuadro 4 hasta encontrar las combinaciones que brindaron los resultados más informativos, tomando en cuenta que se observara mayor número de bandas,

así como que éstas estuvieran bien definidas a lo largo del gel. Se eligieron las combinaciones de iniciadores *EcoRI*+A/ *MseI*+T y *EcoRI*+C/ *MseI* +0. Las secuencias de dichos iniciadores son las siguientes:

EcoRI + A= 5'-GACTGCGTACCAATTC/A

EcoRI + C= 5'-GACTGCGTACCAATTC/C

MseI + 0=5'-GATGAGTCCTGAGTAA

MseI + T=5'-GATGAGTCCTGAGTAA/T

Cuadro 4. Combinaciones de iniciadores utilizadas para la amplificación selectiva de AFLP

	<i>MseI</i> +0	<i>MseI</i> +A	<i>MseI</i> +C	<i>MseI</i> +T	<i>MseI</i> +G
<i>EcoRI</i> +0	1	2	3	4	5
<i>EcoRI</i> +A	6	7	8	9	10
<i>EcoRI</i> +C	11	12	13	14	15
<i>EcoRI</i> +G	16	17	18	19	20
<i>EcoRI</i> +T	21	22	23	24	25
<i>EcoRI</i> +AA	26	27	28	29	30
<i>EcoRI</i> +AC	31	32	33	34	35

5.6 Visualización de resultados

Para la primera serie de ensayos AFLP se visualizaron los productos de amplificación de cada combinación de iniciadores en geles de poliacrilamida al 12 %, el cual se preparó de la siguiente manera: 30 mL de bis-acrilamida 40 %, 10 mL de TBE 10X, 100 µL de persulfato de amonio al 10 %, 58.85 mL de agua miliQ y 15 µL de TEMED, siempre dejando al final al TEMED, dado que es el agente polimerizante. La mezcla se depositó rápidamente entre los moldes de vidrio (placa interior 16 cm x 20 cm, espaciadores y peine de 1.5 mm, placa externa 20 cm x 20 cm), colocando el peine inmediatamente y esperando 80 min para retirarlo. Una vez polimerizado, se colocó el gel en la cámara vertical PROTEAN® II xi cell (Bio-Rad) y se depositaron 15 µL de la muestra (segunda PCR) en cada carril. Se corrió la electroforesis a 105 V durante 18 h. Una vez terminado el corrimiento se sacó el gel y se tiñó con nitrato de plata. Primeramente, el DNA fue fijado en el gel con una solución de etanol-ácido acético-agua (50:10:40) durante 60 min. El gel se colocó luego en una solución de etanol-ácido

acético-agua (10:1:89) durante 1 h. Se descartó la solución anterior y se enjuagó el gel con agua miliQ. Se agregó una solución de nitrato de plata 12 mM y se incubó durante 60 min. Posteriormente, el gel se lavó dos veces con agua miliQ y se reveló con KOH 0.75 M hasta lograr la mejor definición de las bandas, e inmediatamente se detuvo la reacción con una solución de ácido acético al 5 %. Se visualizó el gel en una pantalla de luz blanca.

Para la segunda serie de ensayos una alícuota de la amplificación de AFLP fué separada electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 6.5 % en el secuenciador (LICOR, modelo 4202 G). Los geles fueron preparados con el procedimiento descrito anteriormente para los geles al 12%, pero los reactivos utilizados fueron 20 mL de bis-acrilamida KBPlus 6.5%, 150 μ L de persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED. Los cristales utilizados fueron de 25 cm y con espaciadores de 0.25 mm de espesor, el tiempo de polimerización fue de 90 min. Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes: 1500 V, 40 W, 40 mA, 45° C, velocidad del láser 4, por un periodo de 210 min.

5.7 Análisis de los datos

Se documentaron los sitios de amplificación en el programa computacional Gel-Imagen de Kodak® Digital Science TM 1D y se generó una matriz binaria donde 1 = presencia y 0 = ausencia de fragmentos de amplificación. Con estos datos se creó una matriz de similitud y una matriz de distancia con el método de Nei y Li (1979). Se generó un dendrograma de agrupamiento sin peso de acuerdo con el perfil genético de las cepas que presenten mayor parecido entre ellas con el algoritmo unweighted paired grouping method with arithmetic averages (UPGMA) (Hair *et al.*, 1992), que es un método para la creación de árboles filogenéticos a partir de una matriz de distancia mediante un agrupamiento secuencial que asume una tasa de evolución constante (hipótesis del reloj molecular, Felsenstein, 2004). El dendrograma de agrupamiento también se generó con el algoritmo Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) cuyo principio es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) y de esta manera ir formando niveles de agrupamiento jerárquico basado en el criterio de mínima evolución (reduciendo el largo de las ramas), partiendo de un

árbol en forma de estrella. Este método no asume una evolución a tasa constante de todos los linajes. Para ambos dendrogramas se utilizó el programa Phylip versión 3.6. Posteriormente a esto, se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Weir y Cockerham, 1984; Excoffier y Quattro, 1992; Weir, 1996) dentro del paquete Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), que crea una matriz de distancia entre las muestras para medir la estructura genética de la población; en términos estadísticos, el AMOVA se basa en el análisis permutacional y asume algunas propiedades estadísticas de los datos. Éste análisis de los datos se realizó con base en dos criterios: el grupo de especificidad de hospedante, donde se consideraron dos poblaciones (HGS 1 y HGS 2, nueve cepas en cada población) así como el origen geográfico de las cepas de *Frankia*, donde se consideraron cuatro poblaciones: nueve cepas de Norteamérica, dos cepas de Centroamérica, seis cepas de Sudamérica y una cepa de Europa.

6. RESULTADOS

6.1 Extracción de DNA cromosomal

El método de extracción descrito en el estuche comercial utilizado inicialmente no brindó resultados satisfactorios, por lo que se optimizó adicionando una primera incubación de 45 min. con solución de acromopeptidasa 0.1 mg mL^{-1} . Así mismo, se observó que se obtiene mucho mejor resultado precipitando el DNA a -20° C durante una noche. De esta manera se logró hacer una extracción de DNA genómico satisfactoria de cada una de las cepas en estudio (Figura 2).

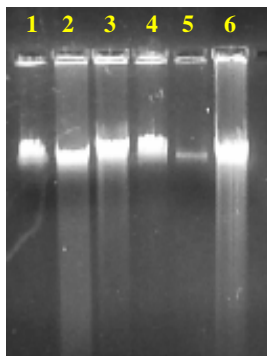


Figura 2. Visualización del DNA de *Frankia*. Carril 1: DNA de la cepa IPNCe20; carril 2: cepa ChI1; carril 3: cepa ReI6; carril 4: cepa TqI5; carril 5: cepa TtI12 y carril 6: cepa ArI3.

6.2 Reacciones de AFLP

Se llevaron a cabo 35 combinaciones de iniciadores AFLP no marcados para tinción con plata y oligonucleótidos marcados con IRD800 para su lectura en el secuenciador. Durante la

optimización de los AFLPs fue importante verificar la correcta digestión de las muestras de DNA mediante visualización en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, donde no se detectó la presencia de DNA no digerido.

6.3 Visualización de los productos de amplificación

Los productos amplificados de la primera serie de reacciones fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con nitrato de plata (Figura 3). Si bien la visualización de los fragmentos de amplificación fué bastante clara, el número de bandas que pudo resolverse fue bajo, lo cual se consideró no suficiente para el estudio y se optó por la detección de los fragmentos amplificados en el secuenciador.

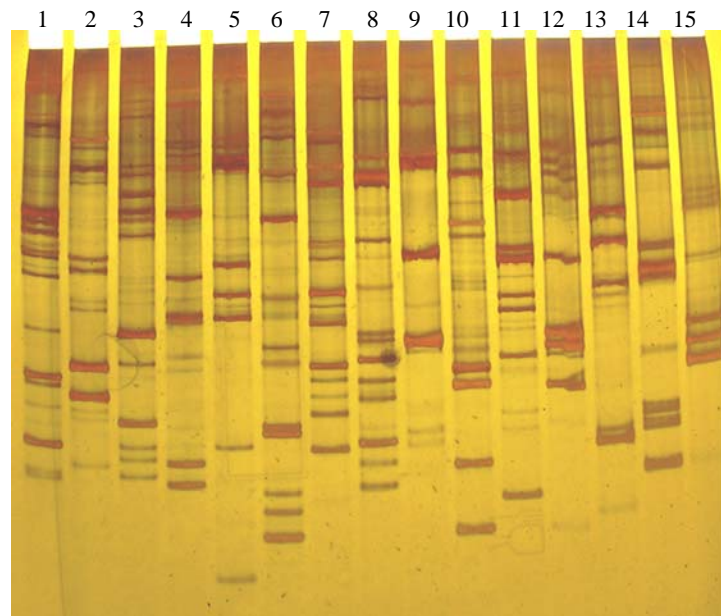


Figura 3. Visualización de los productos de amplificación en geles de poliacrilamida al 15% teñidos con nitrato de plata. Cada carril corresponde a una combinación de iniciadores de las descritas en el Cuadro 4.

Se eligieron para el análisis las combinaciones de iniciadores *EcoRI* + A / *MseI* + T y *EcoRI* + C / *MseI* + 0. Se documentaron 215 sitios de amplificación dentro del rango de 50 a 340 pb para la primer combinación de iniciadores y 138 sitios de amplificación comprendidos dentro del rango de 54 a 200 pb para la segunda combinación (Figura 4). Con los datos producidos por los sitios de amplificación documentados en el programa de Kodak® Digital Science TM 1D se generó una matriz binaria, y a partir de ésta una matriz de distancia.

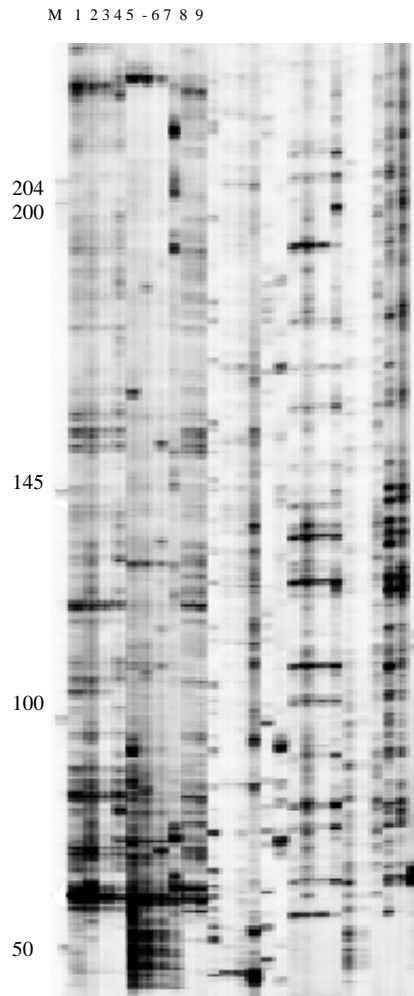


Figura 4. Visualización de los productos de amplificación marcados con IRD800 en geles de poliacrilamida al 6.5%. Carril 1: IPNCe20; carril 2: ACN1; carril 3: ACN14; carril 4: M3; carril 5: ReI6; carril 6: AirI1; carril 7: ArI3, carril 8: AvcI1, carril 9: CesI5.

6.4 Análisis de los datos

El origen geográfico no fue determinante en el agrupamiento de cepas de *Frankia*, ya que se ubicaron cepas de las diferentes regiones dentro de un mismo grupo. Por ejemplo, los grupos C y D incluyeron cepas de tres regiones distintas, el grupo B de dos de ellas, y el grupo A y E fueron homogéneos (Figura 5).

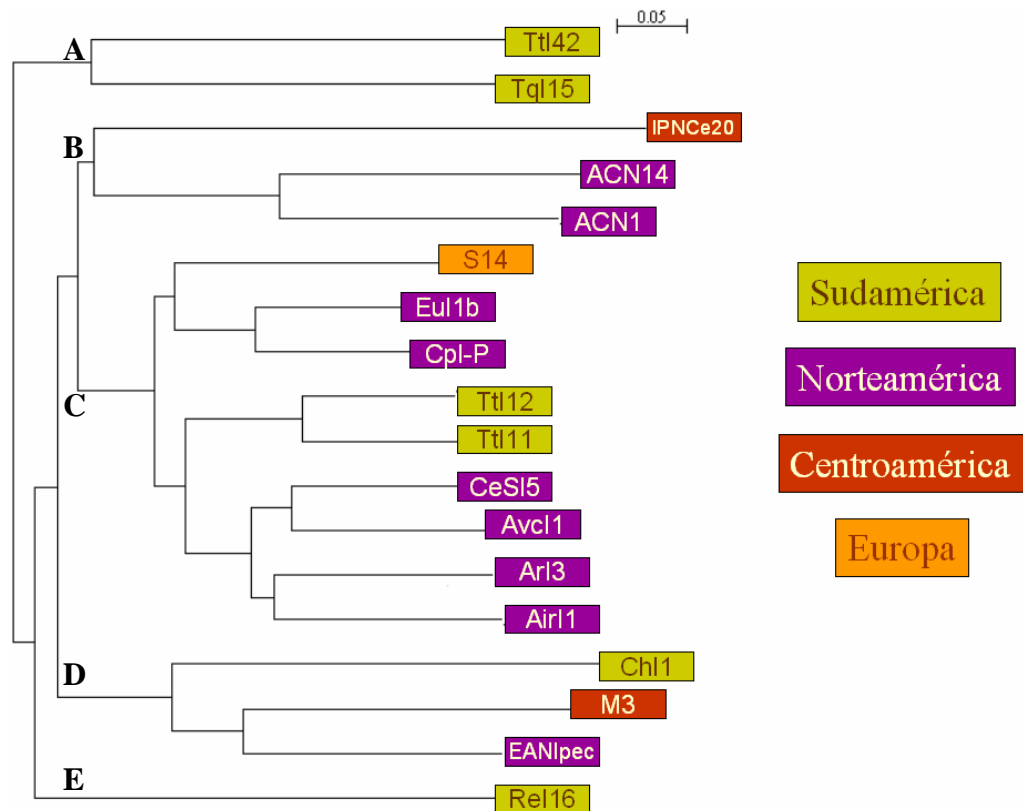


Figura 5. Dendrograma de cepas de *Frankia* con base en el algoritmo Neighbor Joining y su origen geográfico.

Utilizando el algoritmo NJ, se realizó el agrupamiento de cepas con base en el grupo de especificidad de hospedero (HSG) al que pertenecen las cepas de *Frankia* (Normand *et al.*, 1996). Las cepas pertenecientes al HSG 1 tendieron a agruparse en grupos pequeños, mientras que las cepas del HSG 3 se encontraron más dispersas dentro de los grupos. Los grupos A, B, y E son homogéneos, a diferencia del C y D (Figura 6).

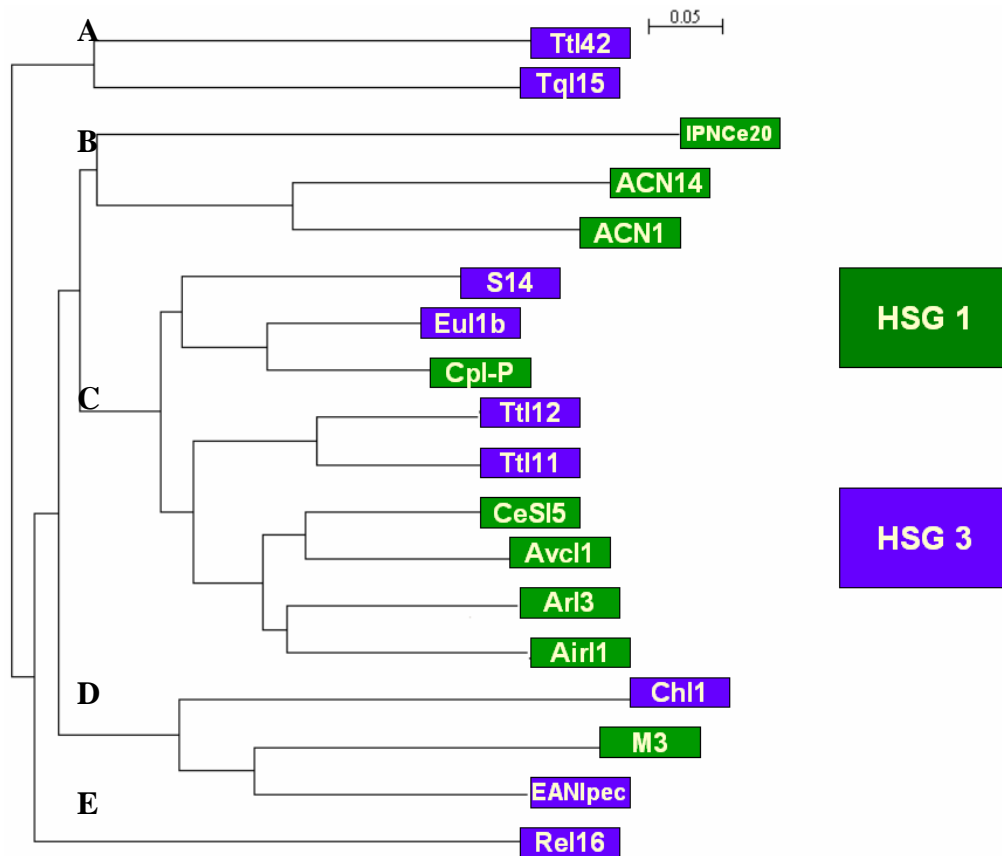


Figura 6. Dendrograma de agrupamiento de las cepas de *Frankia* con base en el algoritmo Neighbor Joining y su grupo de especificidad de hospedero (HSG, Normand, 1996).

Las cepas de Norteamérica se agruparon juntas, así como la mayoría de las cepas de Sudamérica, mientras que una de las cepas de Centroamérica y la de Europa se encontraron mas relacionadas con las cepas de Norteamérica. Sin embargo, en los grupos C y D se encuentran cepas correspondientes a tres diferentes regiones (Figura 7).

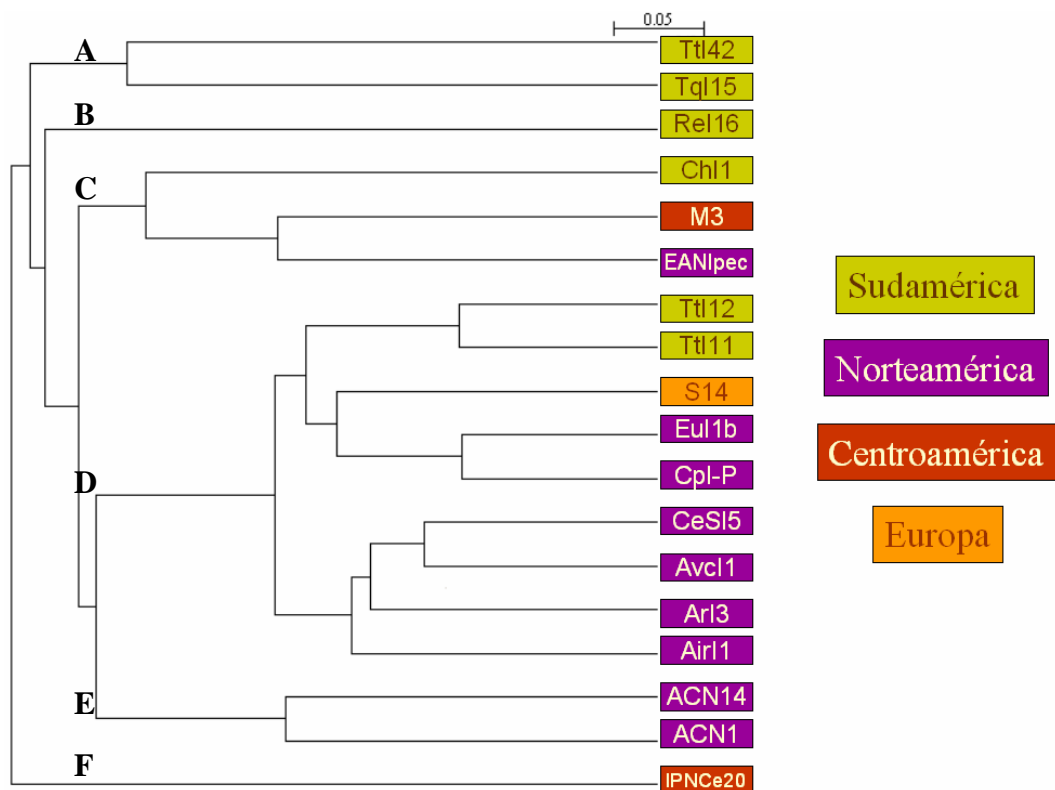


Figura 7. Dendrograma de cepas de *Frankia* con base en el algoritmo UPGMA y su origen geográfico.

El agrupamiento de las cepas con base en el HSG fue más homogéneo y el dendrograma obtenido brindó una panorámica más clara de la relación entre cepas, sin embargo, los grupos C y D presentan cepas del HSG 3 así como de HSG 1. Además, se pudo observar que las dos cepas de la familia Myricaceae (HSG 1) se encuentran más relacionadas con las cepas del grupo HSG 3 (Figura 8).

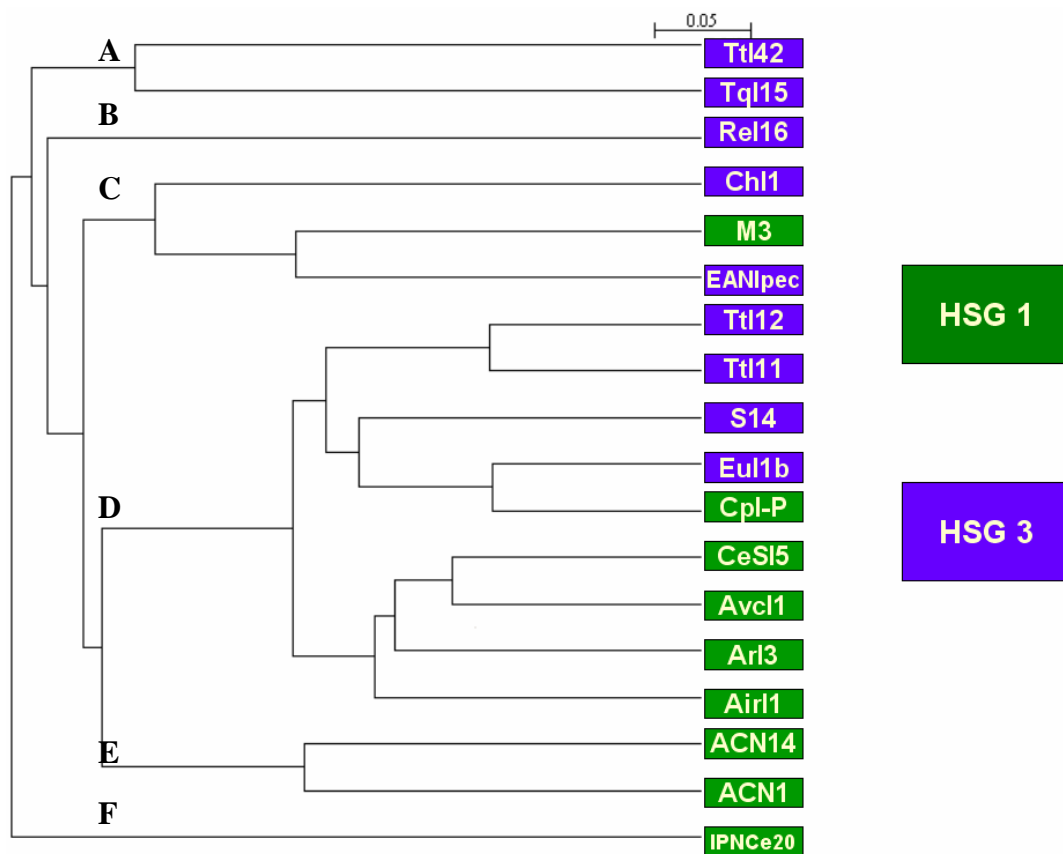


Figura 8. Dendrograma de agrupamiento de cepas de *Frankia* con base en el algoritmo UPGMA y el grupo de especificidad de hospedero (HSG, Normand *et al.*, 1996) al que pertenecen .

Análisis de varianza molecular

El análisis AMOVA de los datos AFLP indicó que no hay diferencia significativa entre las poblaciones de *Frankia*, pero al interior de los grupos se encontraron diferencias significativas entre cepas. Además, la diferencia entre poblaciones fue mayor cuando se analizaron las cepas con base en su origen geográfico, lo que indicó mayor efecto en la diferenciación entre cepas por parte del ambiente que por el hospedante (Cuadros 5 y 6). El índice de fijación (F_{ST}), llamado también coeficiente de coancestría, mide el efecto de la subdivisión de la población, y es la medida de la estructura de las subpoblaciones más inclusiva, y la más útil para examinar la divergencia genética global entre las mismas. Valores de F_{ST} cercanos a 0 indican que no hay subdivisión, no hay divergencia genética entre la población, y el 1 indica extrema subdivisión, aislamiento total. Los valores obtenidos en éstos análisis son cercanos a cero, lo que indica que no hay divergencia entre las cepas de *Frankia* y sugiere gran uniformidad genética al interior del género.

Cuadro 5. AMOVA de los datos AFLP de las cepas de *Frankia* con base en el HSG

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	86.278	1.96296 Va	2.78
Al interior de las poblaciones	16	1097.778	68.61111 Vb	97.22
Total	17	1184.056	70.57407	

Índice de fijación F_{ST} : 0.02781

Pruebas de significancia: 1023 permutaciones

VA y F_{ST} : P (rand. value > obs. value) = 0.15934

P (rand. value = obs. value) = 0.00239

P (rand. value >= obs. value) = 0.16227 + - 0.01163

Cuadro 6. AMOVA de los datos AFLP de las cepas de *Frankia* con base en su origen geográfico

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	3	258.389	5.34936 Va	7.48
Al interior de las poblaciones	14	925.667	66.11905 Vb	92.52
Total	17	1184.056	71.46841	

Índice de fijación F_{ST} : 0.07485

Pruebas de significancia: 1023 permutaciones

VA y F_{ST} : P (rand. value > obs. value) = 0.01662

P (rand. value = obs. value) = 0.00000

P (rand. value >= obs. value) = 0.01662 + - 0.00340

7. DISCUSION

La inclusión de una cepa dentro del género *Frankia* se basó en la combinación de la morfología en el medio de cultivo y el hecho de haber sido aislada de un nódulo actinorrhizo, pero se han encontrado grandes variaciones, tanto fisiológicas como genéticas, que han dificultado enormemente su clasificación (Lechevalier, 1994). Actualmente, las técnicas moleculares han surgido como herramientas que ayudan a la clasificación de cepas dentro del género *Frankia*, sobre todo las basadas en la amplificación de alguna región del DNA para su análisis (Jamann *et al.*, 1993). En la actualidad aún se están tratando de establecer los criterios mínimos necesarios para el establecimiento de especies dentro del género *Frankia*.

El análisis de genomas por medio de los AFLPs fue descrito por Vos *et al* (1995) como una técnica para detectar huellas genómicas mediante amplificación por PCR de fragmentos de restricción del genoma, aplicable a DNA de cualquier origen y complejidad. Una de las principales ventajas del análisis AFLP es que las huellas genómicas pueden ser producidas sin un previo conocimiento del genoma. A partir de 1995, esta técnica ha sido ampliamente aplicada y ha demostrado tener una excelente resolución para estudios de clasificación bacteriana, epidemiología, genotipificación y filogenia (Savelkoul *et al.*, 1999). A pesar de estos beneficios, dentro de los estudios en el ámbito molecular al interior del género *Frankia* no ha sido considerado el análisis AFLP, por lo que la aplicación de esta técnica requirió que para su uso en este trabajo se realizaran algunas optimizaciones que a continuación se discuten con el fin de facilitar estudios posteriores.

La resolución genética del análisis AFLP recae en buena medida en la selección de las enzimas de restricción apropiadas. Se ha sugerido que la combinación de enzimas de restricción *HindIII-TaqI* es apropiada para genomas bacterianos con un contenido de G+C de 40 a 50%. De la misma manera, las combinaciones *EcoRI-MseI* y *ApaI-TaqI* son más apropiadas para genomas con bajo y alto contenido de G + C, respectivamente (Janssen *et al.*, 1996). El contenido de G + C de *Frankia* todavía no se conoce con precisión, y aunque en algunas cepas se ha reportado un contenido de G + C de 66 a 71% (An *et al.*, 1983) en este trabajo se utilizaron las enzimas descritas por Vos *et al.* (1995) que son *EcoRI-MseI*, que si bien son recomendadas para genomas con contenidos bajos de G+C, los perfiles obtenidos en

este estudio mostraron una sensibilidad adecuada para la correcta diferenciación genética entre cepas de *Frankia*.

El otro punto en el que se puso especial énfasis fue en que los fragmentos amplificados tuvieran una distribución uniforme a lo largo del gel, ya que una buena distribución de bandas es crítica para la optimización y un alto nivel de discriminación para la formación de grupos. Un número más alto de polimorfismos dará como resultado un análisis comparativo más acertado y facilitará la discriminación entre cepas (Huys *et al.*, 1996). Con las condiciones que se utilizaron en este estudio, se logró visualizar una distribución de las bandas suficientemente uniforme dentro de un rango de 50 a 340 pb para la combinación de iniciadores *EcoRI* + A y *MseI* + T y de 54 a 200 pb para la combinación *EcoRI* + C y *MseI* + 0. Existen reportes de otros estudios en microorganismos analizados por AFLP donde el número de bandas analizadas va de 30 a 50 o de 20 a 30 bandas para dos combinaciones de iniciadores (Jiang *et al.*, 2000), mientras que en un estudio reportado por On *et al.* (2003) se obtuvieron de 50 a 120 bandas dentro del rango de 50 a 500 pb. Éste comparativo nos indica que el número de fragmentos amplificados y detectados en el presente estudio (215 y 138) supera lo reportado en el análisis de otros microorganismos, lo que posiblemente ofrece una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos. Contrario a lo anterior, se ha sugerido que la elección de las enzimas de restricción y de las secuencias de los iniciadores debe derivarse de estudios preliminares con la bacteria objeto del estudio, así como que no necesariamente un mayor número de bandas tendrá como resultado un mejor poder de resolución (Jiang *et al.*, 2000). Dado que en *Frankia* no hay reportes a la fecha de estudios con AFLPs con los que pudiera hacerse una evaluación previa para la elección de las enzimas de restricción y los iniciadores utilizados, se realizó el estudio con las enzimas de restricción *EcoRI-MseI* por ser las descritas originalmente para la técnica AFLP (Vos *et al.*, 1995). Cabe destacar la importancia de este estudio, que es pionero en el análisis del genoma de *Frankia* mediante la utilización de AFLPs y, además, porque los resultados obtenidos ofrecen un nuevo enfoque en el entendimiento de la diversidad de *Frankia* a nivel genómico.

Con el ensayo AFLP y la visualización de los productos amplificados con nitrato de plata se logró observar bandas definidas, aunque el número de éstas fue bajo (de 17 a 23 por combinación de iniciadores) en comparación con la visualización de bandas marcadas con fluorescencia. Este número bajo de bandas se debe principalmente a dos factores críticos, uno

de ellos es el tamaño del gel (16 cm), ya que con un gel de mayor longitud se resolvería un mayor número de bandas que quedan comprimidas en la parte alta de éstos; y por otro lado, la concentración de acrilamida (12%) resultó ser alta, lo que dificultó la separación de los fragmentos amplificados. Esto sugiere que si se toman en cuenta estas dos consideraciones, es factible hacer el análisis AFLP de *Frankia* con tinción con nitrato de plata; mas en el presente estudio el nivel de resolución de los patrones fue mucho mejor en cuanto a número y separación de las bandas con marcaje fluorescente.

El análisis de conglomerados formó grupos de cepas de *Frankia* mejor definidos con base en la planta hospedante más que por su origen geográfico, aunque se encontraron algunas similitudes porque la distribución en el mundo de las diferentes familias de plantas hospedantes es relativamente específica dado los requerimientos climáticos de las mismas. El agrupamiento de las cepas de *Frankia* generado por el algoritmo UPGMA brindó una visión más clara dado que los agrupamientos menores tuvieron alta correlación con los HSG reportados con base en la comparación de las secuencias del gen 16S rDNA (Normand *et al.*, 1996), aunque dos de los grupos son heterogéneos. Sin embargo, el análisis de varianza molecular reveló gran diversidad genética al interior de las poblaciones de cepas clasificadas con base en su origen geográfico mas que entre ellas, lo que puede ser debido a que el AFLP puede diferenciar hasta el nivel de cepa, lo que explica el grado de varianza tan grande encontrado al interior de las poblaciones, además de que las cepas provienen de diferentes géneros de plantas hospedantes. En el análisis de varianza molecular cuando las cepas se clasificaron con base en su HSG se encontró muy poca diferencia entre las dos poblaciones, no así al interior de los grupos, donde se encontró gran diversidad, misma que puede deberse en parte a los diferentes orígenes geográficos de las mismas y a que los aislamientos provienen de diferentes géneros de plantas hospedantes. Al comparar estos dos análisis, la diferencia entre poblaciones respecto al origen geográfico fue mayor que con respecto a las poblaciones de HSG, aunque en ambos casos dicha diferencia no es estadísticamente significativa. Esto deja entrever que el hospedero de origen es importante, pero no determinante para la asignación de especies. Los resultados del análisis AFLP brindan una visión de la diversidad entre las cepas de *Frankia*, y aunque existe una relación cercana entre cepas aisladas del mismo género de plantas actinorrícicas, hubo diferencias entre los resultados de este estudio del genoma de *Frankia* con los reportados con base en el análisis de las secuencias del gen 16S rDNA, ya que

la variabilidad al interior del género es mayor a los cuatro grupos formados bajo ese criterio, y como género el genoma es poco divergente, por lo que la gran variabilidad que existe al interior no tiene el suficiente peso como para la asignación de especies.

Los aislamientos provenientes de plantas del género *Myrica* históricamente han sido reconocidos como promiscuos, desde los ensayos de infectividad de hospedero (Baker, 1987) hasta el análisis de secuencias del 16S rRNA donde se encontró suficiente diversidad de las cepas al interior de los nódulos de *Myrica* como para infectar plantas provenientes de diferentes familias, además de un nivel de diversidad intermedio en los nódulos de *Comptonia peregrina* (Clawson y Benson, 1999). Estudios posteriores sobre el 16S rDNA de *Frankia* demostraron que las cepas de *Myrica gale* de diferentes sitios de origen tienen diversidad muy baja para un hospedante considerado promiscuo, y de la misma manera poblaciones cercanas de *Frankia* en *Myrica gale* pudieron ser identificadas en su diversidad y especificidad simbiótica (Huguet *et al*, 2001). En el presente estudio se observó que las dos cepas pertenecientes a hospedantes de la familia Myricaceae (HSG 1) CpI-P y M3 estuvieron separadas entre sí, ratificando lo reportado por Huguet *et al* (2001) respecto a la especificidad de algunas de las cepas de *Frankia* dentro de la familia Myricaceae. Los resultados de este análisis mostraron que estas cepas están más relacionadas con las cepas del HSG 3 que con aquellas del HSG 1.

Los resultados obtenidos en este trabajo hacen patente la importancia del estudio del genoma del género *Frankia*, que sin duda alguna revelará aspectos interesantes acerca de los mecanismos que generan la diversidad genética en el género y su evolución y filogenia. Los estudios donde se aplique la técnica AFLP serán parte fundamental dentro de este nuevo campo de estudio para el entendimiento de la diversidad genómica del género *Frankia*.

8. CONCLUSIONES

- El análisis AFLP de las cepas de *Frankia* no mostró relación directa de los agrupamientos con base en el origen geográfico de dichos aislamientos.
- La técnica AFLP demostró ser una herramienta útil para el análisis genómico del género *Frankia*, ya que revela la diversidad que existe al interior del mismo, mayor a los grupos reportados con base en la secuencia de genes específicos.
- A nivel genómico, diferentes cepas del género *Frankia* mostraron tener poca divergencia, por lo que no se encontraron bases que pudieran soportar la diferenciación en especies.

9. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puso de manifiesto la diversidad que existe al interior del género *Frankia*, y por ello se exponen a continuación las siguientes recomendaciones:

Dado que el genoma de tres cepas de *Frankia* muestra alto contenido de G + C (Normand, comunicación personal), sería aconsejable realizar un estudio extensivo utilizando la combinación de enzimas *ApaI-TaqI*, que podría resultar más apropiadas para el análisis de genomas con estas características. Al contar con información de las secuencias del genoma de *Frankia* se sugiere diseñar iniciadores específicos que seguramente serían más informativos en análisis genómicos posteriores. Y con el uso de este tipo de iniciadores podría escudriñarse la posibilidad de analizar el DNA extraído de nódulos actinorrícicos para estudiar también las cepas no aislables, y de esta manera poder realizar un estudio integral.

El conocimiento que puede generarse mediante el análisis del genoma de *Frankia* será importante para seguir escudriñando las diferencias entre cepas procedentes de diferentes plantas hospedantes o regiones geográficas, así como para profundizar en el estudio de la diversidad genómica para entender la especificidad simbiótica de las cepas de este actinomiceto, así como sus características distintivas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akimov, V. N and S. V. Dobritsa. 1992. Grouping of *Frankia* strains on the basis on DNA relatedness. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 372-379.
- Akkermans, A. D. L., D. Hann and D. D. Baker. 1991. The family *Frankiaceae*. In. A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (Eds.). *The prokaryotes* (p.p. 1069-1084). Heidelberg, Alemania.
- An, C. S., J. W. Wills, W. S. Riggsby y B. C. Mullin. 1983. Desoxyribonucleic acid base composition of 12 *Frankia* isolates. *Can. J. Bot.* 61: 2859-2862.
- Baker, D. D. 1990. Methods for the isolation, culture and characterization of the *Frankiaceae*: Soil actinomycetes and symbionts of actinorhizal plants. In H. D. Labeda (Ed.), *Isolation of biotechnological organisms from nature* (p.p. 213-236). McGraw Hill Inc. New York, U.S.A:
- Baker, D. D. 1987. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plant* 70: 245-248.
- Baker, D. D. and D. O'Keefe. 1984. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant Soil* 78, 23-28.
- Becking, J. H. 1970. *Frankiaceae* fam. nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunschorst 1886, 174. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 201-220.
- Becking, J. H. 1974. Family III. *Frankiaceae* Becking 1970, 201. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbon (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. (pp. 701-706). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Benson, D. and W. Silvester. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Review* 57 (2): 293-319.
- Bosco, M., M. P. Fernández, P. Simonet, R. Materassi and P. Normand. 1992. Evidence that some *Frankia* sp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Eleagnus* host specificity groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1569-1576.

- Brisse, S., J. Verhoef. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxitoca* clinical isolates revealed by RAPD, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 915-924.
- Callahan, D., W. Newcomb and J.G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199: 899-902.
- Clawson ML and D. R. Benson. 1999. Natural diversity of *Frankia* strains in actinorhizal root nodules from promiscuous hosts in the family Myricaceae. *Appl Environ Microbiol.* 65:4521-4527.
- Clawson M.L., M. Caru and D. R. Benson. 1998. Diversity of frankia strains in root nodules of plants from the families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3539-3543.
- Cockerham C. C. and B. S. Weir. 1984. Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics.* 40: 157-64.
- Esteve, C. 1997. Is AFLP fingerprinting a true alternative to the DNA-DNA pairing method to assess genospecies in the genus *Aeromonas*?. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 245-246.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131: 479-91.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- Fernández, M. P., H. Meugnier, P.A.D. Grimont and R. Bardin. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:424-429.
- Franklin RB and A. L. Mills. 2003. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiol Ecol.*, 44:335-46.
- Hair, J.F., R. E. Anderson, R. L. Tatham, W. C. Black. 1992. *Multivariate Data Analysis*. Tercera edición. Macmillan Publishing Company.
- Hann, D. 2003. Polyphasic taxonomy of *Frankia*. In *Actinorhizal Symbiosis*. W. E. Newton and K. Pawlowski, eds. Kluwer academic publishers.
- Hann, D., M. J. C. Starrenburg and A. D. L. Akkermans. 1988. Variable compatibility of cloned *Alnus glutinosa* ecotypes against ineffective *Frankia* strains. *Plant soil* 107: 233-243.

- Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Janssen, K. Kersters, P. De Vos, N. A. Logan, N. Ali, and R. C. Berkeley. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae* as emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *Larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:270-279.
- Huguet V, J. M. Batzli, J. F. Zimpfer, P. Normand, J. O. Dawson and M. P. Fernandez. 2001. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* 67(5): 2116-22.
- Huss-Danell, K., and Myrold, D. D. 1994. Intragenic variation in nodulation of *Alnus*: Consequences for quantifying *Frankia* nodulation units in soil. *Soil Biol. Biochem.* 26: 525-531.
- Huys, G., P. Kampfer, M. Altwegg, I. Kersters, A. Lamb, R. Coopman, J. Luthy-Hottenstein, M. Vancanneyt, P. Janssen and K. Kersters. 1997. *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol.* 47:1165-71.
- Huys, G., R. Coopman, P. Janssen, K. Kersters. 1996. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol.* 46:572-80.
- Huys, G., R. Coopman, M. Vancanneyt, I. Kersters, W. Verstraete, K. Kersters, and P. Janssen. 1993. High resolution differentiation of aeromonads. *Med. Microbiol. Lett.* 2: 248-255.
- Jamann, S., M. P. Fernandez y P. Normand. 1993. Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP, application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol. Ecol.* 2: 17-26.
- Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, and K. Kersters. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 142: 1881-1893.
- Jiang, S. C., M. Matte, G. Matte, A. Huq and R. R. Colwell. 2000. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol.* 66:148-53.

- Jonas, D, B. Spitzmuller, F. D. Daschner, J. Verhoef and S. Brisse. 2004. Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. Res Microbiol. 155:17-23.
- Kuhn, I., G. Huys, R. Coopman, K. Kersters and P. Janssen. 1997. A 4-year study of the diversity and persistence of coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well. Can J Microbiol. 43:9-16.
- Lechevalier, M.P. 1994. Taxonomy of the genus *Frankia* (actinomycetales). Int. J. Syst. Bacteriol. 44:1-8.
- Nei M y W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 76: 5269-73.
- Normand, P., S. Orso, B. Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J. Dowson, L. Evtushenko and A.K. Misra. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of Family *Frankiaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:1-9.
- Normand P, J. Bousquet. 1989. Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. J. Mol. Evol. 29: 436-47.
- Normand, P., and M. Lalonde. 1986. The genetics of actinorhizal *Frankia*: a review. Plant Soil, 90: 429-453.
- On SL, Harrington CS, Atabay HI. 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. J. Appl. Microbiol. 95:1096-1105.
- Quispel, A., A. B. Svendsen, J. Schripsema, W. J. Baas, C. Erkelens and J. Lugtenberg. 1989. Identification of a dipterocarpol as isolation factor for the induction of primary isolation of *Frankia* from root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Mol. Plant-Microbe Interact. 2: 107-112.
- Rosbrook, P. A., A. J. P. Burggraaf and P. Roddoll. 1989. A comparison of two methods and different media for isolating *Frankia* from *Casuarina* root nodules. Plant soil 120: 187-193.
- Saitou N and M. Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-25.

- Savelkoul, P. H. M., H.J.M. Aarts, J. de Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, W. Rademaker, L. Schouls and J. A. Lenstra. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3083-3091.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. of Geneva, Switzerland.
- Simonet P, Grosjean MC, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P. 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3278-86.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kämpfer, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Trüper, L. Vauterin, A. C. Ward and W. B. Whitman.. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Sys. and Evol. Microbiol.* 52: 1043–1047.
- Swensen and Benson. 2004. Evolution of actinorhizal host plants and *Frankia* endosymbionts. In *Actinorhizal Symbiosis*. W. E. Newton and K. Pawlowski, eds. Kluwer academic publishers.
- Tenover, F. C., R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, P. Goering, G. Hancock, G. A. Hebert, B. Hill, R. Hollis, W. R. Jarvis, B. Kreiswirth, W. Eisner, J. Maslow, L. K. McDougal, J. M. Miller, M. Mulligan and M. A. Pfaller. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
- Valdés, María. 2003. *Frankia* ecology. In *Actinorhizal Symbiosis*. W. E. Newton and K. Pawlowski, eds. Kluwer academic publishers.
- Valdés, M. 2003. biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios
- Valdés, M, L. Vázquez y N. O. Pérez. 2001. Genetic marker RAPDs y rep-PCR for ecological studies of the nitrogen fixing symbiosis *Frankia-Casuarina*. *E. E. S. R. N. News.* 34: 27-29.
- Valsangiacomo, C., F. Baggi, V. Gaia, T. Balmelli, R. Peduzzi and J. C. Piffaretti. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism in molecular typing of *Legionella*

- pneumophila* and application to epidemiological studies. J. Clin. Microbiol. 33: 1716-1719.
- Van Belkum, A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin. Microbiol. Rev. 7: 174-184.
- Vaneechoute, M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. Mol. Biotechnol. 6: 115-142.
- Vásquez, L., N.O. Pérez and M. Valdés. 2000. Isolation and symbiotic characteristics of Mexican *Frankia* strains associated with *Casuarina*. App. Soil. Ecol. 14:249-255.
- Villee, C., E. P. Solomon, C. E. Martin, D. W. Martin, L. R. Berg y P. W. Davis. Biología. 1992. Segunda edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill.
- Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23(21):4407-14.
- Wayne, L. G., R. C. Good, E.C. Bottger, R. Butler, M. Dorsch, T. Ezaki, W. Gross, V. Jonas, J. Kilburn, P. Kirschner, M. I. Krichevsky, M. Ridell, T. M. Shinnick, B. Springer, E. Stackebrandt, I. Tarnok, Z. Tarnok, H. Tasaka, V. Vincent, N. G. Warren, C. A. Knott, and R. Johnson. 1996. Semantide- and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 280-297.
- Weber, A. 1990. Host specificity and efficiency of nitrogenase activity of *Frankia* strains from *Alnus incana* and *Alnus glutinosa*. Symbiosis 8: 47-60.
- Weir BS. 1996. Genetic data analysis, II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Wolters, D. J. 1998. Ineffective *Frankia* in wet alder soils. Ph. D. thesis Rijksuniversiteit Groningen, The Netherlands.

11. GLOSARIO

Actinomiceto. Bacteria filamentosa

Actinorriza. Se refiere a la simbiosis formada por la bacteria *Frankia* y el nódulo radical de la planta.

Agrosilvicultura. La agrosilvicultura, en el sentido amplio de la palabra, cubre desde técnicas específicas de cultivos asociados hasta el aseguramiento en general del uso óptimo y sostenido de la tierra por medio de la integración de la agricultura, la ganadería y la silvicultura. Definida estrictamente, la agrosilvicultura comprende sistemas de uso y manejo de la tierra que incluyen, en la misma parcela simultáneamente o en secuencia, arboles forestales y cultivos agrícolas (sistemas silvopastoriles), o los tres tipos básicos de productos: cultivos agrícolas, forraje animal y productos forestales (sistemas agrosilvopastoriles).

Bromuro de etidio. Compuesto que se intercala entre las bases del DNA y fluoresce al irradiarlo con luz ultravioleta, esto nos permitirá al observar un gel bajo luz UV visualizar las bandas del DNA fluorescente. Sustancia mutagénica, carcinógena y venenosa si es ingerida por vía cutánea, oral o subcutánea. Su descomposición por calor genera Oxido Nítrico (NO) que es un gas tóxico.

Cepa. Es un grupo de aislamientos caracterizados de un microorganismo. Esencialmente esto se aplica a aislamientos de laboratorio, cultivos o selección, raza, variedad, *forma specialis*.

Desnaturalización. Capacidad de la doble hélice del DNA de separarse en sus dos cadenas componentes.

Diazotrófico. Metabolismo mediante el cual algunos microorganismos pueden transformar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno orgánico.

Diversidad genómica. Es la variación en el genoma entre las especies o individuos, lo que ha permitido a las poblaciones adaptarse a cambios climatológicos, así como a diferentes condiciones ambientales.

DNA. Macromolécula compuesta de ácido fosfórico, azúcar desoxirribosa y bases orgánicas nitrogenadas, que es donde está contenida la información genética de todos los organismos.

DNA ligasa. Enzima que une fragmentos de DNA.

DNA polimerasa. Enzimas encargadas de construir nuevas cadenas de DNA.

Electroforesis. Migración de partículas a través de una matriz obedeciendo a un campo eléctrico.

Electroforesis en geles de agarosa. Electroforesis que se lleva a cabo en un gel de agarosa y se emplea para separar moléculas de DNA de entre 100 y 50 kb en longitud. La migración del DNA en geles de agarosa depende de su tamaño y de la forma o arreglo de las moléculas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Técnica mediante el cual fragmentos de DNA se movilizan y separan gracias a una corriente aplicada a través de un gel, el cual está compuesto por una pequeña molécula orgánica (acrilamida) con enlaces transversales que forman una criba molecular. Este tipo de electroforesis tiene una mejor resolución que la realizada en geles de agarosa.

Endófito. Es un hongo (o actinomiceto) que vive dentro de las plantas.

Endonucleasas de restricción (enzimas de restricción). Enzima que corta el DNA en una secuencia específica.

Esporangio. Estructura donde están alojadas las esporas de un hongo filamentoso o un actinomiceto.

Filogenia. Un esquema de clasificación que indica la relación evolutiva entre organismos.

Gen. Segmento de DNA que codifica una molécula de RNA, que generalmente se traduce en una proteína.

Genoma. Información genética completa y única para cada especie de organismo.

Hábitat. Lugar donde un organismo vive (nicho).

Iniciador. Secuencia corta de nucleótidos (oligonucleótido) que permite iniciar la síntesis de DNA a lo largo de una secuencia molde de DNA.

Método de Neighbor-Joining. Método matemático para la construcción de árboles filogenéticos, cuyo principio es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y de esta manera ir formando niveles de agrupamiento jerárquico basado en el criterio de mínima evolución (reduciendo el largo de las ramas), partiendo de un árbol en forma de estrella; éste método no asume una evolución a tasa constante de todos los linajes.

Nucleótido. Unidad de moléculas de DNA y RNA que contienen un fosfato, un azúcar y una base orgánica nitrogenada.

Huella genómica (Perfil genético, “fingerprinting”). El patrón de bandas revelado después de la electroforesis de productos de PCR o de digestión que puede o no indicar diferencias entre los organismos estudiados.

Perenne. Se refiere a aquellas plantas que pueden vivir tres años o más. Procede del latín *perennis*, de eterno o duradero.

Polimorfismo. Diferencias en la secuencia de DNA entre individuos. Variaciones genéticas que ocurren en más de 1 % de la población pueden ser consideradas útiles para la identificación de individuos o para el análisis de genomas con alto porcentaje de similitud.

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP). Técnica basada en la PCR para analizar genomas de cualquier organismo. Se basa en la digestión del genoma total con endonucleasas de restricción, ligación de adaptadores que reconocen los sitios de restricción de los fragmentos, posteriormente se realiza una primera PCR en la cual los pares de iniciadores van dirigidos hacia los adaptadores anteriormente ligados. A los productos de amplificación se les realiza una segunda PCR (PCR selectiva), donde se utilizan juegos de iniciadores que varían en la terminación nucleotídica, con la adición de uno, dos o tres nucleótidos, estos pueden ser utilizados con o sin marcaje con fluorescencia o radioactividad.

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs). Diferencia genética entre individuos que se detecta comparando fragmentos de DNA generados mediante digestión con una o más enzimas de restricción.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Método para la amplificación de una región de DNA mediante repetidos ciclos de síntesis de DNA *in vitro*.

Ribotipificación. Estudio de los genes que codifican para los RNAs ribosomales de un organismo.

Silvicultura. Sector de las ciencias forestales que se ocupa del desarrollo y cultivo de bosques. Podríamos afirmar que es una ciencia hermana de la agricultura, diferenciándose de ésta en varios aspectos, uno de los cuales tiene relación con el tiempo de espera para la cosecha: en tanto la agricultura obtiene sus frutos o cosechas en meses, la silvicultura las obtiene después de muchos años.

Simbiosis. Es una interacción entre dos o más organismos, viviendo más o menos juntos una asociación íntima o incluso la fusión de dos organismos distintos. El término huésped es usado para el más largo - o el más grande - de los dos miembros de una simbiosis. El miembro más pequeño es llamado simbiótico.

Taxonomía. La **taxonomía** es la parte de la biología que estudia la clasificación de los seres vivos, los taxa (o taxones). La clasificación actual de los seres vivos sigue un criterio jerárquico. Del griego *taxis* (ordenamiento) y *nomos* (norma).

Vesículas. En *Frankia* se refiere a las estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico. Su cubierta está formada por lípidos que producen un efecto óptico de refringencia al microscopio.