

Frankia y la simbiosis actinorrízica

Héctor Hugo Bautista Guerrero,* María Valdés*

RESUMEN. El factor mayor limitante del desarrollo de los seres vivos en el planeta es el nitrógeno. En algunos casos la adquisición de nitrógeno se realiza de manera simbiótica; las bacterias que forman parte de este tipo de asociaciones pertenecen a dos grupos filogenéticos bien establecidos, los Rhizobia y las actinobacterias del género *Frankia*. ¿Qué sabemos sobre *Frankia*, este actinomiceto que se asocia con géneros de plantas pertenecientes a 8 diferentes familias botánicas? ¿Por qué no hay especies en este género? La secuenciación del 16S rDNA y su contribución a la filogenia bacteriana, así como las técnicas de huellas dactilares moleculares, han revolucionado nuestra percepción en la filogenia y taxonomía de todos los organismos vivos, incluyendo a *Frankia*. La taxonomía polifásica trata de integrar los diferentes tipos de información, como son el fenotipo, genotipo y la filogenia de los microorganismos. Esto constituye la taxonomía bacteriana moderna de este actinomiceto, aunque sigue siendo difícil hacer una clasificación definitiva de *Frankia* en especies. Sin embargo, este conocimiento revela mucho sobre la diversidad genética y distribución de este actinomiceto fijador de nitrógeno.

Palabras clave: *Frankia*, fijación de nitrógeno, actinorriza, diversidad, filogenia.

I. INTRODUCCIÓN

El factor mayor limitante del desarrollo de los seres vivos en la tierra es el nitrógeno. Por ello, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) aunada al abastecimiento de energía proporcionada por la fotosíntesis, constituye la base de la vida en nuestro planeta. El amonio, producto de la FBN, provee el elemento básico de los dos grupos más importantes de moléculas, los ácidos nucleicos y las proteínas, es decir, forma parte de las bases que constituyen los elementos esenciales del DNA y del RNA, responsables de almacenar y transformar la información genética.

La FBN es el proceso que realizan exclusivamente organismos procariontes pertenecientes a los dominios Bacteria y Archea y juega un papel importante en la aportación de

ABSTRACT. Nitrogen is the major factor limiting the growth of the living beings in the earth. In several instances the supply of this nutrient by plants is acquired by symbiosis. Symbiotic bacteria belong to 2 well established phylogenetic groups, the protobacteria Rhizobia and the actinobacteria *Frankia*. What do we know about *Frankia* the actinomycete associated to plants belonging to 8 different botanic families? Why there are not yet species in the genus? The 16S rDNA sequencing and the fingerprint techniques contribution to the bacterial phylogeny have dramatically changed our perception on the phylogeny and the taxonomy of all the living beings including *Frankia*. The polyphasic taxonomy intends to integrate different types of information: phenotypic methods, genotypic methods, and microbial phylogenies. These methods are used in the modern bacterial taxonomy for *Frankia*, although it is still difficult to formulate reliable and definitive classification of *Frankia* in species. However, this information provides much light on the genetic diversity and distribution of this nitrogen-fixing actinomycete.

Key words: *Frankia*, nitrogen fixation, actinorrhiza, diversity, phylogeny.

nitrógeno a los ecosistemas. En algunos casos este proceso se puede realizar de manera simbiótica, en asociaciones en las que participan bacterias y plantas. En general, las bacterias que forman parte de este tipo de asociaciones pertenecen a dos grupos filogenéticos bien establecidos, los Rhizobia y las actinobacterias del género *Frankia*.

Pero, ¿qué sabemos sobre *Frankia*, este actinomiceto que se asocia con géneros de plantas pertenecientes a 8 diferentes familias botánicas? ¿Cómo ha sido utilizado el conocimiento actual y cuál ha sido su impacto en beneficio de la humanidad? El mayor impacto debería ser a través de una forestería y agroforestería sostenibles. Estas familias, a diferencia de las plantas leguminosas que tienen un origen tropical, tienen un origen templado. Los países latinoamericanos, muchos tropicales por latitud, tienen vastas regiones templadas de montaña con urgente necesidad de recuperar la fertilidad de sus suelos y de reforestar.

El reciente conocimiento de las secuencias del genoma completo de tres cepas tipo de *Frankia* que forman nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de diferentes familias botánicas han resaltado las fuerzas evolutivas que han conformado la genética, no sólo de la simbiosis, sino de la bacteria. Las secuencias han mostrado además,

* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 México, D.F.

que estos genomas son dinámicos. En este marco genético, nosotros hemos revisado los datos de esta historia porque estos datos han conducido a establecer su diversidad y filogenia. Una revisión exhaustiva sobre la taxonomía polifásica de este organismo es la de Hahn (2008); aquí se han tomado en cuenta los genes estructurales de la nitrogenasa, los genes de asimilación del producto fijado, los genes que participan en el reciclaje del hidrógeno, los genes llamados “housekeeping”, los plásmidos y los elementos móviles.

II. LAS PLANTAS ACTINORRÍZICAS

Frankia establece simbiosis en las raíces de 25 géneros de plantas distribuidos en 8 familias que son llamadas colectivamente plantas actinorrízicas (PA) y que habitan en muy variados ecosistemas (Huss-Danell 1997, Valdés 2008). La asociación se llama Simbiosis Actinorrízica.

El establecimiento de esta simbiosis se consuma con la generación de estructuras coraloides en las raíces de las PA llamados nódulos fijadores de nitrógeno. Esto contribuye a que las PA sean capaces de crecer en suelos de baja fertilidad, en ambientes extremos como arenas salinas, áreas semiáridas y ambientes polares. Además, las PA crecen en suelos deficientes en nitrógeno y posteriormente establecen la sucesión ecológica. Estas propiedades hacen de las PA unos excelentes prospectos en los procesos de reforestación y también para ser empleadas como plantas pioneras en la restauración de suelos perturbados (Diem y Dommergues 1990, Schwenke y Carú 2001, Benson *et al.*, 2004).

Otro aspecto que resalta la importancia ecológica de las PA es que la tasa de fijación de nitrógeno es igual o más alta que en las leguminosas (Torrey 1978, Dommergues 1997, Busse 2000). Se ha reportado por ejemplo que las tasas de acumulación de nitrógeno en plantaciones de *Alnus* van de 60 a 320 kg/ha/año (Paschke *et al.*, 1989).

Las PA son árboles y arbustos perennes, con la única excepción del género *Datisca* que es herbácea, son de distribución mundial y predominantes en ambientes templados (Tjepkema y Torrey 1979, Huss-Danell 1997). La presencia de estas plantas en los trópicos es rara, sólo el árbol *Casuarina* crece en subtrópicos y trópicos (Diem y Dommergues 1990). Los géneros *Alnus*, *Casuarina* y *Elaeagnus* son los que se encuentran distribuidos más ampliamente, ya que han sido empleados exhaustivamente en procesos de reforestación (Dommergues y Subba Rao 2000).

El hecho de que sean perennes influye de manera considerable en su potencial ecológico, ya que constantemente están aportando nitrógeno al suelo y a las plantas vecinas, ya sea a través de la red micorrízica (pues las PA

forman ectomicorriza y/o micorriza arbuscular) o por la descomposición de las hojas que liberan nitrógeno y que forman parte de la materia orgánica en descomposición (Dawson 1990, Huss-Danell 1997, Wall 2000). Algunos estudios han demostrado que esta materia orgánica repercute directamente sobre las poblaciones bacterianas de *Frankia* en aspectos como supervivencia y capacidad de nodulación (Sayed 2003, Nikel *et al.*, 2001).

Algunas plantas actinorrízicas se consideran promiscuas porque pueden formar asociaciones fijadoras de nitrógeno con cepas de otras plantas hospedadoras; éste es el caso del género *Myrica*, de la familia Myricaceae, familia botánica más antigua en la simbiosis fijadora de nitrógeno. La reevaluación actual de la especificidad hospedero-simbionte, estudiada a través de la secuenciación del ITS del 18S-28S rDNA y del gen *rbcL*, ha mostrado que filogenéticamente las Myricaceas han divergido en dos grupos de diferente especificidad (Huguet *et al.*, 2005).

Aunque considerado como un grupo de plantas taxonómicamente diverso, los estudios moleculares indican que las plantas actinorrízicas se encuentran más relacionadas que como se pensaba (Swensen *et al.*, 1994, Magia y Bousquet 1994, Roy y Bousquet 1996). De acuerdo con la filogenia construida con base en la secuencia del gen *rbcL*, las plantas actinorrízicas forman una agrupación coherente en el Grupo Eurosoid I (Magia y Bousquet 1994, Soltis *et al.*, 1995) junto con las leguminosas. La filogenia delineada con este gen sugiere que ambos grupos de plantas poseen un ancestro común (Soltis *et al.*, 1995). Swensen (1996) y posteriormente Jeong *et al.*, (1999) con evidencias filogenéticas mostraron que la capacidad de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno ha tenido al menos 4 orígenes en linajes diferentes de angiospermas. Además esta filogenia sugiere múltiples orígenes evolutivos de la simbiosis actinorrízica y que dentro del grupo de las PA ha habido procesos de ganancia y pérdida de la capacidad de establecer simbiosis (Swensen y Benson 2008).

En cuanto a estudios de la interacción planta-microsimbionte, Bagnarol *et al.* (2007) analizaron por electroforesis de dos dimensiones con identificación por MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization/time of flight fingerprinting) el efecto de extractos radicales de *Myrica* sobre el proteoma de *Frankia*; el patrón global de proteínas se vio alterado por los extractos de la planta. Cincuenta proteínas fueron identificadas en la base de datos de la secuencia de los genomas de las cepas AcN14a y EaN1pec. La respuesta más evidente fue en la regulación de proteínas de estrés oxidativo, lo que sugiere una reorganización del metabolismo de la bacteria para protegerse contra las sustancias de respuesta de defensa de la planta.

III. FRANKIA

El microbiólogo suizo J. Brunchorst acuñó en 1887 el nombre de *Frankia* en honor a su maestro A. B. Frank. El género *Frankia* está compuesto por actinomicetos de crecimiento lento, heterotróficos, Gram positivos, con un alto porcentaje de G + C (66-77%) y que a diferencia de *Rhizobium*, fija nitrógeno tanto *in vitro* como en simbiosis (Pawlowsky y Bisseling 1996).

Este actinomiceto, aislado en cultivo puro hace 30 años por el grupo del Dr. Torrey (Callaham *et al.*, 1978), presenta tres estructuras morfológicas características, las hifas ramificadas y septadas consideradas las células vegetativas que posteriormente se diferenciarán en otras estructuras especializadas: los esporangios multiloculares que almacenan esporas inmóviles, y las vesículas reductoras de nitrógeno que, como su nombre lo dice, son la sede de la nitrogenasa. Los diazótrofos aerobios como *Frankia* padecen el llamado “dilema de fijación de N₂ de O₂”, pues la nitrogenasa es muy sensible al O₂ y sólo funciona en un ambiente libre del mismo. Pues bien, en contraste con todos los rhizobios, *Frankia* cuenta con su propio sistema de protección contra el oxígeno, formando estas estructuras especializadas llamadas vesículas que restringen el acceso del O₂ al interior de las mismas.

La estructura de la pared celular de las vesículas consta de láminas lipídicas que se acomodan en formas de capas y que además contienen hopanoides en alta concentración (Berry *et al.*, 1991, 1993, Rosa Putra *et al.*, 2001), esta estructura evita la difusión del oxígeno hacia el interior, protegiendo así a la nitrogenasa (Tjepkema *et al.*, 1981, Silvester *et al.*, 1988, Berry *et al.*, 1993).

Las tres estructuras mencionadas se hacen presentes *in vitro* (bajo ciertas condiciones), e *in planta* en la mayoría de las simbiosis (Newcomb *et al.*, 1979). La formación de vesículas y esporangios se puede controlar *in vitro*, modificando ciertas condiciones de cultivo; las vesículas en medio de cultivo sin fuente de N y los esporangios con baja cantidad de P. Se ha demostrado que en simbiosis es la planta quien determina la morfogénesis de las vesículas (Torrey 1985). Este polimorfismo sugiere que existe un fino proceso de regulación en la morfogénesis de la bacteria y que está dirigido directamente por el ambiente en el que se encuentra, es decir, este es un evento netamente adaptativo.

La determinación de la secuenciación completa del genoma de *F. alni* cepa ACN14a ha permitido caracterizar su proteoma, en especial su compartimento extracelular. Alloisio *et al.* (2007) analizaron 126 proteínas por electroforesis de dos dimensiones identificándolas por MALDI-TOF, encontrando que la fracción extracelular contiene algunas enzimas glicolíticas que carecen de se-

ñales de excreción, así como algunas proteínas abundantes de resistencia a estrés. La expresión de algunas proteínas involucradas en asimilación de N y del sistema de defensa oxidativo se mostró afectada por la presencia o ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

1. DESIGNACIÓN DE CEPAS

En 1987 Baker intentó hacer la primera clasificación subgenérica de las cepas de *Frankia* con base en su espectro de infección de hospedero. Hizo ensayos de inoculación cruzada de diversos hospederos con cepas aisladas de PA diferentes, lo cual le permitió definir grupos de infección de hospedero (HSG por sus siglas en inglés). Posteriormente se ha probado que el grado de especificidad de algunas cepas y el de ciertas plantas es variable; aun dentro de un mismo género de plantas existe esta variación en el establecimiento de la simbiosis (Bosco *et al.*, 1992).

Es importante señalar que la designación de especies dentro del género *Frankia* ha sido un tema controversial. Por diversas razones, hasta la fecha, no se ha podido designar especies a este género. En la práctica nos referimos todavía a la mayoría de los aislamientos de *Frankia* con acrónimos basados tanto en la planta de origen o por los números de identificación de la cepa que usa un sistema de código creado en 1983 (Lechevalier 1983).

Debido a la relación intrínseca que existe entre las cepas y las plantas hospederas, la designación inicial consistió en nombrarlas de una manera tal que se hiciera referencia a la planta de la que fueron aisladas, colocando la primera letra del género seguida por la primera letra de la especie, agregando además un código numérico determinado por el autor. Por ejemplo, una cepa que se aisló de *Alnus rubra* se llamó ArI₃ (Lalonde *et al.*, 1988). Este sistema de acrónimos se consideró confuso, sin embargo se sigue empleando hasta la fecha.

Esta clasificación nominal de las cepas de *Frankia* se ha utilizado para catalogarlas en las diferentes colecciones internacionales de cepas tipo como la ARS-NRRL (Agricultural Research Service-Northern Regional Research Laboratory), cuya dirección electrónica es <http://nrml.ncaur.usda.gov>.

2. GENÉTICA DE FRANKIA

Frankia comparte características genéticas con otras actinobacterias: elevado contenido de G+C (66-72%), así como una gran versatilidad metabólica, notablemente de actividades líticas (Girgis y Schwenke 1993).

Hasta la fecha no se ha podido establecer un sistema homólogo para la transformación genética y tampoco se han obtenido vectores de clonación (Lavire y Cournoyer 2003,

Normand *et al.*, 2007b). Por lo tanto, los estudios se han basado en el aislamiento particular de regiones génicas y su posterior clonación y expresión en sistemas heterólogos. Los primeros genes que se han elegido para ser caracterizados son aquellos que se encuentran implicados en los procesos metabólicos más sobresalientes de esta bacteria: los genes de la fijación de nitrógeno, los genes *gln* y *hup* y los elementos móviles.

2.1 Genes implicados en la fijación de nitrógeno

Los productos de los genes *nif* están involucrados directamente en la reducción del nitrógeno atmosférico o dinitrógeno (N_2) a amonio (NH_4^+), es decir, en la expresión del complejo nitrogenasa.

Como es bien conocido, la nitrogenasa es un complejo enzimático de dos componentes semejante al de otros microorganismos diazotófos. El primer componente es una ferroproteína homodimérica (Fe) y el segundo es una molibdoferroproteína (MoFe) heterotetramérica con estructura $\alpha_2\beta_2$.

Aunque la nitrogenasa de los nódulos actinorrízicos no se ha purificado, los estudios con homogeneizados de nódulos y con extractos libres de células han mostrado que esta nitrogenasa es semejante a la de los rizobios (Benson *et al.*, 1980). Este complejo multimérico está codificado por 3 genes, *nifHDK*. Empleando la secuencia de estos genes como sondas, se detectaron señales positivas de hibridación en el DNA total de *Frankia* CpI₁ (Ruvkun y Ausubel 1980).

Mientras que el gen *nifH* codifica la ferroproteína también conocida como dinitrógeno reductasa los genes *nifD* y *nifK* codifican para las subunidades α y β de la molibdoferroproteína, respectivamente (Normand y Bousquet 1989, Rees *et al.*, 1998). Posteriormente se encontró esta misma región en *Frankia* ArI₃ y también se determinó que la región homóloga para los genes *nifH* y *D* están en la misma posición con respecto a *nifK*, determinando de esta manera que estos genes se encuentran distribuidos de manera contigua y en la secuencia *nifHDK* (Normand *et al.*, 1992). La caracterización de estos genes en algunas cepas se logró en 1987 (Ligon *et al.*, 1987).

Dentro de los estudios de hibridaciones heterólogas hubo algunos que permitieron identificar otros dos genes además de los ya mencionados, *nifA* y *nifB* (Simonet *et al.*, 1988). Años después se registró la secuencia completa de los genes estructurales de la nitrogenasa de las cepas ArI₃ y EuIK1 (Normand *et al.*, 1992, Nalin *et al.*, 1995, Kim y An 1997).

La búsqueda de genes *nif* se ha continuado extensamente en diferentes cepas de *Frankia* y se han obtenido sus secuencias, tantas que en el año 2002 se reportó que el 40% de las secuencias de *Frankia* almacenadas en el Gen-

Bank corresponden a genes *nif* (Lavire y Cournoyer 2003).

En *Frankia* EuIK1 se han descrito al menos 14 genes involucrados en la fijación de nitrógeno, 10 de ellos (*nifV*, *nifH*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB*, *nifU* y *nifS*) participan en la síntesis del cofactor hierro-molibdeno y se encuentran agrupados de manera canónica dentro del cluster de genes *nif* (Jae y An 2003). La excepción a esta posición se encuentra en *Frankia* EaN1pec en la cual el gen *nifV* se encuentra lejos de su localización original (río arriba del gen *nifH*) (Normand *et al.*, 2007b). La función específica de cada uno de estos genes es descrita de manera amplia en la revisión de Lavire y Cournoyer (2003).

Los espacios intergénicos que separan los genes *nif* han sido analizados por PCR-RFLP, el IGS *nifD-K* se ha estudiado preferentemente sobre el *nifH-D* debido a que es más largo y más variable en secuencias (Normand *et al.*, 1992 Jamman *et al.*, 1993). El análisis en esta región ha permitido determinar la diversidad genética entre cepas nodulantes de *Elaeagnus* sp. (Jamman *et al.*, 1993) *Alnus* sp. (Cournoyer y Normand 1994, Nalin *et al.*, 1995) *Casuarina* sp. (Rouvier *et al.*, 1992 y 1996, Trujillo Cabrera 2007) y de *Ceanothus* sp. (Murry *et al.*, 1997), así como divergencias en las interacciones simbióticas de Casuarina con las cepas pertenecientes al mismo grupo genómico (Nasr *et al.*, 2007).

La regulación de los genes *nif* en los diferentes diazotófos presenta variaciones en cuanto a los circuitos involucrados en la activación o represión de los genes. Sin embargo existen elementos regulatorios como el activador transcripcional codificado por el gen *nifA* y el factor sigma alternativo $\sigma 54$ que aparentemente se encuentran conservados, al menos en las eubacterias diazotróficas. En los diazotófos el producto del gen *nifA* actúa como un activador transcripcional de los demás genes *nif*, su expresión es regulada por proteínas sensoras de oxígeno, amonio y otros metabolitos y por la enzima represora *nifL*, originalmente descrita en *Klebsiella pneumoniae* y en *Azotobacter* (Dixon *et al.*, 1998, Martínez-Argudo *et al.*, 2004).

En la cepa *Frankia* EuIK1 se describieron dos genes *nifA*, el *nifA*₁ y otro al que se le llamó *nifA*₂. El primero presenta un comportamiento clásico y se expresa de manera constitutiva en las células, el segundo presenta un comportamiento similar a *nifH*, es decir que sus niveles de expresión varían con respecto al proceso de fijación de nitrógeno (Lee *et al.*, 2001).

Existen otros genes que se encuentran relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno, la mayoría de ellos participan en la regulación de la actividad nitrogenasa, los procesos de asimilación de nitrógeno y en la protección de la inactivación de esta enzima por efecto de compuestos como el hidrógeno y el amonio.

2.2 Genes *gln*

El producto final de la reacción catalizada por la nitrogenasa es el ion amonio. Este compuesto inhibe la síntesis de novo de la nitrogenasa, por lo cual los organismos diazótrofos poseen sistemas de asimilación que se encargan de utilizar dicho compuesto de una manera casi inmediata a su producción. Dentro de los procesos de asimilación iniciales se encuentra el de la enzima glutamina sintetasa, enzima codificada por los genes *gln*.

De manera semejante a otros microorganismos, *Frankia* codifica para la síntesis de 2 glutamina sintetetasas, los genes han sido designados *glnI* y *glnII* y sus productos GSI y GSII respectivamente (Edmans *et al.*, 1987). La GSI es una enzima dodecamérica, regulada por la adenilación individual de sus subunidades y es inhibida por retroalimentación negativa de metabolitos derivados de la glutamina (Tsai y Benson 1989).

La GSII es un homooctámero que en *Frankia* es sintetizado tanto en las hifas como en las vesículas. Esta enzima es regulada por las concentraciones de nitrógeno en el medio en el que se encuentra la bacteria, además muestra ciertas semejanzas con las glutaminas sintetetasas de otros procariontes y con las que se encuentran presentes en los organelos y citosol de algunas células eucariontes (Tsai y Benson 1989). Lo anterior sugiere que el origen del gen *glnII* fue un proceso de duplicación del gen *glnI*, anterior a la divergencia de los linajes eubacteria y eukarya (Kumada *et al.*, 1993, Robertson y Tartar 2006).

Cornouyer y Lavire (1999) determinaron el grado de similaridad de los genes *glnI* y *glnII* entre cepas pertenecientes a diferentes especies genómicas, como son AcoN24d y AcN14a; encontraron un porcentaje de similitud de 93% y 95% respectivamente, lo que puede conducir al empleo de este gen para inferir relaciones filogenéticas entre diversas cepas de *Frankia*.

2.3 Genes *hup*

El hidrógeno (H_2) es un co-producto de la reacción de reducción del nitrógeno por la nitrogenasa. Algunos diazótrofos poseen un sistema de oxidación del H_2 (actividad hidrogenasa) que permite reciclar el hidrógeno liberado, conduciendo a una conservación de energía que conduce a un impacto positivo sobre la eficiencia del proceso de fijación de nitrógeno.

Existe una amplia variedad de hidrogenasas, las cuales participan en diversos procesos metabólicos. Aquellas que participan específicamente en la asimilación y reciclaje del hidrógeno son codificadas por los genes *hup* (de hydrogen uptake). En *Frankia* las hidrogenasas están presentes tanto en hifas como en vesículas y su localización

es membranal (Sellstedt y Lindbland 1990). La hidrogenasa de asimilación de hidrógeno en *Frankia* posee en su sitio activo un cofactor de níquel-ferro y es un heterodímero compuesto por dos subunidades, una pequeña que es codificada por el gen *hupS* y cuya función es la de transferir electrones a la subunidad mayor que es codificada por el gen *hupL* (Mattson y Sellstedt 2000).

Recientemente se determinó que existen dos sintones de estos genes, el primero contiene los genes *hupS1*, *hupL1* y el segundo a *hupS2* y *hupL2*. Se sugirió además que el origen del segundo sintón fue un evento de duplicación génica del primero, teniendo fuertes implicaciones evolutivas sobre el mecanismo de asimilación del hidrógeno. Los genes *hupS1* y *hupL1* se sobreexpresan en condiciones de vida libre, mientras que se supone que los genes del segundo sintón están implicados en eventos simbióticos, ya que se ha detectado un aumento considerable en los transcritos de estos genes al estudiar sus niveles de expresión en nódulos radicales (Leul *et al.*, 2007).

Las relaciones evolutivas y la diversidad de las cepas de *Frankia* se han inferido con base en el estudio de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno. Los más utilizados han sido el gene *nifH* (Valdés *et al.*, 2005, Normand *et al.*, 1992), el gen *glnII* (Clawson *et al.*, 2004) y el gen *hup* (Leal *et al.*, 2007). Los resultados no han sido muy diferentes a los obtenidos con las otras regiones genéticas, es decir los agrupamientos obtenidos han sido consistentes con los ya anteriormente reportados.

2.4 Plásmidos

Una de las primeras interrogantes que se ha planteado sobre la genética de *Frankia* es la existencia de DNA extracromosómico que estuviera localizado de manera episomal. La búsqueda de plásmidos en *Frankia* tuvo al menos dos finalidades, la localización de funciones metabólicas importantes que no se encontraran codificadas en el cromosoma y la utilización de plásmidos autóctonos como vectores de clonación y expresión de transgenes.

Desde 1983 Normand *et al.* identificaron plásmidos en 4 cepas de distintos grupos de infección, el tamaño de estos plásmidos es variable, de 7 a 32 kb. Se descartó la presencia de actividades esenciales para la nodulación y en uno de ellos (el de 190 kb) se encontraron secuencias homólogas de los genes *nif* (Simonet *et al.*, 1986). Previamente los plásmidos de *Frankia* fueron clasificados con base en sus perfiles de restricción y en su tamaño molecular (Simonet *et al.*, 1985).

Para optimizar la construcción de vectores de clonación plasmídicos, aunque sin éxito, se determinó la secuencia completa de los plásmidos pFQ11 (Xu *et al.*, 2002) y pFQ12 (John *et al.*, 2001). Por su parte, Lavire *et al.*

(2001) desarrollaron un plásmido derivado de pFQ31, el vector pFQ199, con el cual logran transformar células de *Escherichia coli*, pero no fue posible hacerlo con el actinomiceto *Streptomyces lividans*. Estos resultados sugieren que existen otros factores desconocidos hasta el momento, que evitan que dichos plásmidos puedan ser empleados como vectores de clonación en *Frankia*.

2.5 Elementos móviles

Los elementos móviles como secuencias de inserción, transposones y secuencias profágicas tienen un impacto considerable sobre la dinámica de los genomas y sobre su evolución (Kazazian 2004). Además, gracias a sus características estos elementos pueden ser empleados en la biología molecular para generar mutaciones dirigidas, así como la inserción de material genético específico.

Frankia ArI₅ presenta una secuencia única de inserción (IS) que incluye el gen de una transposasa, cuya función no ha podido ser determinada; sin embargo se le otorgó una función potencial como herramienta genética (John *et al.*, 2004).

Con el análisis de las secuencias del genoma de las tres cepas tipo de *Frankia*, se demostró que este tipo de elementos móviles forman un porcentaje importante del total de sus genes; en *Frankia* CcI₃ un 3.4%, en *Frankia* EaN1pec un 4.1% y en *Frankia* AcN14a un 0.6% (Normand *et al.*, 2007b). En primera instancia estos valores reflejan el dinamismo y la plasticidad presentes en los genomas de estas cepas.

IV. FILOGENIA Y DIVERSIDAD

Todas las cepas de *Frankia* están ahora clasificadas en un linaje separado entre los actinomicetos Gram positivos de alta proporción G+C con la siguiente posición en la jerarquía bacteriana (<http://www.cme.msu.edu/Bergeys/taxonomyinfo.html>):

La definición taxonómica actual del género *Frankia* es aquel grupo de actinobacterias fijadoras de nitrógeno (tanto en simbiosis como en vida libre) que además de presentar las características morfológicas descritas anteriormente, poseen una pared celular tipo III, un patrón de fosfolípidos PI, lípidos hopanoides (bacteriohopanetetrol y bacteriohopanetetrol fenilacetato monoéster) en su pared celular, así como el azúcar 2-O-metil-D-manosa (Lechevalier 1994).

A partir de que se consiguió el aislamiento *in vitro* de estas actinobacterias, se acordó que hasta ese momento era imposible definir especies dentro del género y por consiguiente todas las cepas aisladas se considerarían miembros de la misma especie, confiando en que posteriormente se

lograría definir la especiación dentro del género a través del estudio de características ecológicas, fenotípicas y genotípicas de cada cepa aislada (Lechevalier 1984, Baker 1987, Lalonde *et al.*, 1988).

Se han realizado numerosos estudios de cepas haciendo un análisis de cada una de las características mencionadas anteriormente. Sin embargo, aun con la conjunción de los datos arrojados por los diferentes experimentos, existen varios aspectos fenotípicos, genotípicos y ecológicos que no han permitido establecer una filogenia concreta y mucho menos la designación del nivel taxonómico de especies.

En un principio, cuando aun no se conseguía el aislamiento de cepas de *Frankia*, se aplicó un protocolo de inoculación cruzada de plantas, empleando como inóculo un macerado de nódulos y de esta manera se definieron 6 especies del género *Frankia* (Becking 1970).

Baker (1987) empleando diferentes cepas en cultivo realizó ensayos de inoculación cruzada, con lo cual hizo una reevaluación de los datos propuestos por Becking y a partir de sus resultados describió 4 HSG que se superponen, con lo cual se demostró que la clasificación propuesta anteriormente no era precisa. Si bien que existieron limitaciones en este último estudio sumadas a la variabilidad presente en los espectros de nodulación de ciertas PA, este parámetro tiene un alto impacto sobre la caracterización de cepas de *Frankia*.

Los análisis posteriores se enfocaron en los aspectos fenotípicos de *Frankia*. Con este tipo de análisis Lalonde *et al.*, (1988) definieron 2 especies, *Frankia alni* y *F. elaeagni*, separando la primera en 2 subespecies. Los estudios posteriores sobre DNA/DNA (Fernández *et al.*, 1989) no confirmaron el establecimiento de las especies propuestas.

Otros estudios se basaron en técnicas inmunológicas, con lo cual se agruparon algunas cepas de *Frankia* en diferentes serotipos (Baker *et al.*, 1981, Lechevalier y Lechevalier 1984). Así también se analizaron propiedades bioquímicas como proteínas totales (Benson *et al.*, 1984), manosa (Mort *et al.*), azúcares totales (St. Laurent *et al.*, 1987), actividades enzimáticas (Horrière 1984, Benoist y Schwenke 1990), perfiles de ácidos grasos (Simon *et al.*, 1989, Mirza *et al.*, 1992) así como proteasas (Girgis y Schwenke 1993) e isoenzimas (Gardes *et al.*, 1987).

A la par de los análisis anteriores se comenzó con los análisis del genoma. Se empleó la técnica de hibridación ADN-ADN, la cual se considera hasta el momento como el mejor criterio para definir especies en procariontes (Stackebrandt *et al.*, 2002, Gevers *et al.*, 2005). An *et al.*, (1985) agruparon las cepas analizadas en dos genogrupos y posteriormente Fernández *et al.*, (1989), empleando un número más extenso de cepas, lograron definir 9 especies genómicas. Las diferentes genoespecies correlacionaron

con los grupos de hospedero. Establecieron 3 especies genómicas dentro de las cepas compatibles con *Alnus*, 1 en las cepas compatibles con *Casuarina* y 5 en las cepas compatibles con *Elaeagnus*, demostrando así que este último es un grupo más heterogéneo y con mayor diversidad de cepas. Análisis subsecuentes, empleando la misma técnica sugirieron la inclusión de otras dos genoespecies, que incluyen cepas compatibles con *Alnus* y *Elaeagnus* (Lumini y Bosco 1996). Los datos obtenidos en otros estudios de esta naturaleza (Akimov *et al.*, 1991) no han podido ser correlacionados debido a que se utilizaron otras cepas para el análisis, más aún, debido a las limitaciones prácticas de esta técnica, las cepas no cultivables no pudieron ser incluidas en el esquema de análisis.

El advenimiento de técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación, así como la descripción de genes con información filogenética y evolutiva contenida en ellos ha permitido realizar estudios más profundos. El gen que codifica la subunidad pequeña del ribosoma (16S rDNA) ganó aceptación para ser empleado en estudios filogenéticos, evolutivos y ecológicos, debido a sus propiedades de reloj molecular y a que puede ser amplificado fácilmente por una reacción de PCR empleando diferentes muestras biológicas. En los primeros estudios de secuenciación de este gen en *Frankia* se describió la presencia de regiones hipervariables entre las diferentes cepas (Hahn *et al.*, 1989, Harry *et al.*, 1991), lo que ha sido útil para identificar poblaciones de *Frankia* tanto en plantas como en suelo (Hahn *et al.*, 1999).

La secuencia del ITS 23S-16S ha sido útil para estudiar la diversidad genética de cepas de *Frankia*, sin embargo los agrupamientos obtenidos por el análisis de esta secuencia son muy semejantes a los obtenidos con el IGS *nifD-K*. Los datos de algunos de estos estudios pueden revisarse también en la dirección electrónica <http://ulises.umh.es/rissc> (Ribosomal Internal Spacer Sequence Collection).

Un estudio reciente hecho por Gtari *et al.*, (2007) reafirma la importancia de esta región génica, al demostrar que además de la hipervariabilidad que existe en su secuencia primaria de nucleótidos, existe la formación de estructuras secundarias de heterodúplex, lo cual influye en la migración electroforética de los fragmentos amplificados y por consiguiente se generan polimorfismos dentro de una misma cepa en estudio.

En 1992 Normand *et al.* reportaron un análisis aplicado al operón de los genes ribosomales en *Frankia* nodulante de *Casuarina*, definiendo que posee sólo dos copias. Con la secuenciación del genoma de las tres cepas tipo se corroboró el número de operones ribosomales y efectivamente las cepas ACN y CcI₃ poseen dos operones, mientras que la EaN posee tres.

Nazaret *et al.*, (1991) desarrollaron un estudio analizando la secuencia de una región del 16S rDNA que contiene a su vez 2 regiones hipervariables, dicha región (*rrn*) mostró un poder de discriminación alto y los resultados correlacionaron con los obtenidos con hibridaciones ADN-ADN. Sin embargo, no encontraron una diferencia marcada con respecto a las genoespecies 4 y 5. En este estudio se incluyeron cepas aisladas de nódulos de *Casuarina* que no forman nódulos en este árbol y que no habían sido incluidas en otros estudios (D₁₁, CeI₂ y CcI₂), que se agruparon con las cepas compatibles de *Elaeagnus*.

Los análisis de secuencias parciales del gen 16S rDNA también permitieron determinar las relaciones filogenéticas de cepas pertenecientes a grupos ya estudiados (Rouvier *et al.*, 1992) y de otros grupos de infección conformados en su mayoría por cepas no cultivables, incluyendo aquellas nodulantes de los géneros *Datisca* y *Coriaria* (Mirza *et al.*, 1992, 1994), las nodulantes de plantas de la familia Rhamnaceae (Benson *et al.*, 1996, Clawson *et al.*, 1998, Murry *et al.*, 1997, Ritchie y Myrold 1999), Rosaceae (Vanden Heuvel *et al.*, 2004) así como de la familia Myricaceae (Clawson y Benson 1999).

En el año de 1996, Normand *et al.*, llevaron a cabo un extenso análisis de cepas de la secuencia completa del gen 16S rDNA de *Frankia* de los diferentes grupos de infección, lograron establecer la filogenia del género, que es la más aceptada hasta el momento. Definieron 4 grupos filogenéticamente congruentes:

1. Grupo bastante diverso que incluye las cepas infectivas de *Alnus*, las de *Casuarina* y las de *Myrica*.
2. Contiene las cepas no cultivables infectivas de las familias de plantas Coriariaceae, Datisceae, Rosaceae y al género *Ceanothus*.
3. Incluye las cepas infectivas de las familias de plantas Elaeagnaceae y Rhamnaceae.
4. Formado por aquellas cepas llamadas atípicas que no son capaces de nodular ni de fijar nitrógeno.

Aunado a la clasificación propuesta los autores sugirieron hacer la enmendación de la familia Frankiaceae, la cual sólo debe incluir al género *Frankia*, excluyendo de esta manera al otro género de actinobacterias que forman esporangios multiloculares como el género *Geodermatophilus*, el cual se había incluido hasta ese momento dentro de la misma familia por su semejante morfología en términos de esporangios multiloculares.

La bacteria aceptada como más cercana a *Frankia* es *Acidothermus cellulolyticus*, bacteria celulolítica aislada de aguas termales con quien comparte en niveles altos lípidos hopanoides en su membrana envolvente. Esto ha sido

comprobado con la secuenciación completa del gen ribosomal 16S y del gen *recA* (Marechal *et al.*, 2000).

Huguet *et al.*, (2001) al estudiar la diversidad entre las cepas infectivas de la planta hospedera considerada promiscua, *Myrica*, a través del polimorfismo del gen 16S rDNA, demostraron que existe cierto grado de especificidad simbiótica en algunas especies del género, como es *M. gale*.

A pesar de que el valor del 16S rDNA como marcador filogenético es innegable, actualmente se sabe que su poder de discriminación es limitado (ayuda a designar hasta nivel taxonómico de género) y determina filogenias ambiguas cuando las cepas son muy parecidas (Gürtler 1999, Stackebrandt *et al.*, 2002, Gtari *et al.*, 2007).

Otros estudios de la diversidad de *Frankia* han empleado técnicas de huella dactilar muy sensibles, las cuales permiten diferenciar entre cepas muy parecidas basándose en un número considerable de marcadores polimórficos generados por ciertas regiones palindrómicas repetitivas distribuidas en el genoma, como son las REP, BOX y ERIC. Dichas secuencias al ser amplificadas generan patrones electroforéticos que equivalen a huellas dactilares para cada espécimen. En este sentido se han analizado las poblaciones de *Frankia* de los principales grupos de infección (Murry *et al.*, 1995) y también cepas de grupos particulares, por ejemplo, se han estudiado cepas compatibles con *Ceanothus* (Murry 1997, Jeong y Myrold 2001) y aquellas compatibles con *Casuarina equisetifolia* (Pérez *et al.*, 1999, Valdés *et al.*, 2001).

Con la gran cantidad de estrategias que se han aplicado y todos los datos que con ellas se han obtenido se ha puesto de manifiesto la gran diversidad de las cepas de *Frankia*, así como la influencia que en algunos casos, sobre ella tienen la localización geográfica de sus hospederos, lo que ha conducido aparentemente al desarrollo de genotipos de *Frankia* con afinidades diferentes para el género de planta hospedera aun dentro de la misma familia de plantas (Benson y Dawson 2007).

V. EL IMPACTO DE LA GENÓMICA EN EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD, EVOLUCIÓN Y FILOGENIA DE *FRANKIA*

En el 2007, investigadores de diferentes países (Normand *et al.*, 2007a) publicaron las secuencias del genoma de tres cepas tipo de *Frankia*, la CcI₃ (aislada de *Casuarina cunninghamiana*) y la AcN14a (aislada de *Alnus crispa*) que pertenecen al Grupo 1 y la cepa EaN1pec (aislada de *Elaeagnus angustifolia*) del Grupo 3.

Un análisis preliminar comparativo de estos genomas se ha publicado recientemente (Normand *et al.*, 2007b, Rawnsley y Tisa 2007). La diferencia más evidente entre

estos tres genomas es su tamaño. Mientras que el de la cepa CcI₃ mide 5.4 Mb (siendo el más pequeño de los tres), el de la cepa AcN14a mide 7.5 Mb y el de la cepa EaN1pec el más grande, con un tamaño de 9.0 Mb.

La diferencia tan grande en tamaño, así como el número de genes, puede ser explicada por eventos de pérdida y ganancia de genes a través del tiempo; la transferencia lateral pudo haber tenido también un alto impacto en la evolución de estos genomas. Esto ha sido corroborado con la presencia y descripción de secuencias plasmídicas y fágicas insertadas en el genoma de *Frankia*. Otro dato de importancia es la cantidad de transposasas codificadas; las cepas CcI₃ y EaN1pec codifican en conjunto 10 veces más elementos de este tipo que la cepa AcN14a, confirmando, de manera virtual, mayor estabilidad al genoma de esta última cepa nodulante de las especies de árbol *Alnus*, conocido en México con la voz nativa de aile, en Costa Rica como jaúl, en Colombia, como chaquiro.

Existe correlación entre los datos mencionados anteriormente y la geografía de las relaciones simbióticas que establecen estas cepas. Por ejemplo el grupo de cepas que nodulan al género *Alnus* sp. es diverso, las cepas que lo constituyen están distribuidas ampliamente en el mundo y su presencia en un suelo específico no está determinada por la presencia de su hospedero (Myrold y Huss-Danell 1994). El género *Betula* sp. de la misma familia botánica, estimula la población rizosférica de *Frankia* nodulante de *Alnus* sp. (Smoolander 1990, Paschke y Dawson 1992), así mismo las cepas nodulantes del árbol *Gymnostoma*, se han encontrado abundantemente en la rizosfera de una Rhamnacea que no forma nódulos fijadores de nitrógeno (Gauthier *et al.*, 2000), así mismo las cepas que nodulan el árbol *Elaeagnus* sp. se han encontrado en actinorrizas de *Casuarina* (Gauthier *et al.*, 1999). Lo anterior, sumado a la relativa estabilidad de su genoma ha llevado a suponer que estas cepas no requieren establecer simbiosis de manera continua. Por el contrario, el aislamiento de la planta hospedera pudo favorecer la contracción del genoma de la bacteria; así, las cepas compatibles con *Casuarina* sp. (como la cepa CcI₃) presentan una diversidad muy baja, están estrechamente relacionadas entre sí y no se encuentran habitando suelos donde no se encuentra su planta hospedera. Este grupo de actinobacterias podrían estar evolucionando hacia el establecimiento de una simbiosis mucho más específica o a una simbiosis obligada (Simonet *et al.*, 1999, Normand *et al.*, 2007b), por las siguientes razones: la dificultad para aislar las cepas *in vitro* (en comparación de aquellas cepas pertenecientes a otros grupos), la ineficiencia de su dispersión en suelos, la alta especificidad de infección de su hospedero, así como la reducción que ha sufrido su genoma y por lo tanto su capacidad competitiva y de supervivencia como organismos saprófitos.

Parece que el aumento en tamaño del genoma de la cepa EaN1pec se ha debido a procesos de duplicación de genes. En análisis a diversas poblaciones bacterianas del suelo se ha observado que el efecto de la duplicación de genes permite a dichas poblaciones explorar nuevos nichos ecológicos y adaptarse a ellos.

La carencia de delecciones en los genes, la duplicación de éstos y la adquisición de nuevos genes se relaciona con la historia biogeográfica de la simbiosis y especiación de la planta; los hospederos del grupo de EaN1pec tienen una distribución mundial, por lo mismo habitan en diversos ecosistemas donde las condiciones ambientales y edáficas son muy variadas.

VI. PERSPECTIVAS

Los estudios investigados en esta revisión y otros más, han permitido establecer la gran diversidad que existe entre los miembros del género *Frankia*. Aun así, este género se considera un cluster filogenético bastante semejante, en el cual no se ha podido establecer el nivel de especie.

Si bien se han descrito algunas genoespecies, los especialistas exigen que además de los datos genotípicos, es necesario establecer características ecológicas y fenotípicas distintivas de cada especie, otorgándole así una definición más "natural" y no tan práctica al concepto de especie (Gevers *et al.*, 2005).

Hasta el momento se considera que dos bacterias pertenecen a la misma especie si poseen un valor de similitud mayor o igual a 70% determinado por la técnica de hibridación de ADN-ADN. Esta técnica implica problemas prácticos y no permite el análisis de un número alto de cepas, los valores obtenidos no son acumulables y no se puede aplicar a cepas no cultivables. Debido a lo anterior es difícil pensar que en algún momento se definirán especies en *Frankia* aplicando esta técnica.

Actualmente se ha sugerido como una alternativa, emplear las secuencias de genes constitutivos esenciales (housekeeping) que posean tasas de evolución similares a la del genoma, para inferir relaciones filogenéticas entre bacterias. Las variaciones acumuladas en su secuencia no están sometidas a una selección como es el caso de otros genes y su transferencia horizontal es poco probable (Gevers *et al.*, 2005, Hanage *et al.*, 2006). A la técnica que utiliza los fundamentos anteriores para establecer relaciones filogenéticas se le ha llamado MLSA (Multilocus Sequence Analysis). Dicha técnica puede ser fácilmente aplicable para el estudio filogenético del género y en él se pueden incluir tanto cepas cultivables como aquellas que son refractarias al cultivo *in vitro*.

Otra de las técnicas propuestas como sustituto de la hibridación ADN-ADN es el marcador AFLP (Amplified

Fragment Length Polymorphism). Esta técnica permite realizar análisis a nivel genómico y genera huellas moleculares específicas de cada especie. Además de que permite identificar marcadores polimórficos con relevancia ecológica y/o fenotípica.

Acosta *et al.*, (2005) hicieron un estudio preliminar de diversos aislamientos de *Frankia* empleando la técnica de AFLP; determinaron la diversidad genómica de estas cepas y lograron asociarla en parte con su geografía. Sin embargo, el número de cepas estudiado fue bajo y sería necesario incluir más cepas en este tipo de estudios y seleccionar de manera individual marcadores polimórficos para hacer una conjunción de características que permitan distinguir y definir especies.

Además, de las anteriormente mencionadas, sería deseable aplicar otro tipo de técnicas moleculares y bioinformáticas para generar una filogenia más precisa del género. También se espera que próximamente sea secuenciado el genoma de una cepa del Grupo 2 (cepas no cultivables de las familias Coriariaceae, Datisceae, Rosaceae y el género *Ceanothus*) y así se tendrá una visión más amplia de lo que ha sucedido con respecto a la evolución de los genomas de *Frankia* a través del tiempo.

Es de suma importancia establecer la diversidad de las cepas de *Frankia* y saber de qué manera afecta la eficiencia de la simbiosis fijadora de nitrógeno que establecen con sus hospederos para así seleccionar aquellas más eficientes en su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno. Estos conocimientos permitirían generar biotecnologías en el ámbito de la inoculación de PA resultando en una alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados, además de crear campañas de reforestación de suelos perturbados y erosionados con estas plantas de importancia ecológica en tan diversos ecosistemas.

La evidencia de que la biogeografía de las cepas de *Frankia* depende en cierta medida de la presencia de la planta y de ciertos factores edáficos (como es el caso de las cepas nodulantes del árbol *Gymnostoma* (Navarro *et al.*, 1999) requiere de más estudios para identificar los factores que afectan la distribución de las bacterias y de las plantas. Así mismo es importante continuar los estudios para identificar el impacto de la planta en la expresión de los genes de la bacteria.

Es necesario también enfocar los estudios sobre las poblaciones de grupos de *Frankia* en diferentes tipos de suelo, lo que contribuiría a ubicar estas actinobacterias simbiotes entre las poblaciones bacterianas del suelo de actinomicetos de crecimiento lento parientes de *Frankia* que con mucha frecuencia crecen cuando se trata de aislar esta última (Ramírez-Saad *et al.*, Valdés *et al.*, 2005).

Las crecientes bases de datos de secuencias específicas de poblaciones también específicas abren el camino para

estudios más precisos sobre la distribución y seguimiento de las poblaciones de *Frankia* en el medio ambiente, lo que puede conducir al adecuado manejo de las plantas actinorrízicas y su microsimbionte para el beneficio humano.

AGRADECIMIENTOS

HHBG estudiante del doctorado en la ENCB/IPN y en la Universidad Claude Bernard de Lyon, Francia, agradece a CONACYT por su beca y al Programa ECOS/ANUIES por su estancia académica en Francia. El trabajo realizado por MV sobre la simbiosis actinorrízica se ha llevado a cabo con fondos de US National Academy of Sciences (BOSTID), SEP/CONACYT, UCMEXUS/CONACYT y del IPN.

Agradecemos los valiosos comentarios y sugerencias de los árbitros anónimos que revisaron este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Acosta E., A. Cruz, M. Valdés & A. Medoza. 2005. Genome diversity of *Frankia* strains from different origins and host plants by AFLP analysis. *Symbiosis* 39:97-103.
2. Akimov V., S.V. Dobritsa & O. S. Stupar. 1991. Grouping of *Frankia* strains by DNA-DNA homology: How many genospecies are in the genus *Frankia*? pp.635-636. In M. Polsteinelli, R. Materassi & M. Vincenzini (Eds). *Nitrogen Fixation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
3. Alloisio N., S. Félix., J. Maréchal., P. Pujic., Z. Rouy., D. Vallenet., C. Medigue & P. Normand. 2007 *Frankia alni* proteome under nitrogen-fixing and nitrogen-replete conditions. *Physiol Plant* 130:440-453.
4. An, C. S., W. S. Riggsby & B. C. Mullin. 1985. Relationships of *Frankia* isolates based on deoxyribonucleic acid homology studies. *Int J Syst Bacteriol* 35:140-146.
5. Bagnarol E., J. Popovici., N. Alloisio., J. Maréchal., P. Pujic., P. Normand & M.P. Fernandez. 2007. Differential *Frankia* protein patterns induced by phenolic extracts from Myricaceae seeds. *Physiol Plant* 130:380-390.
6. Baker, D., W. L. Pengelly & G. J. Torrey. 1981. Immunological analysis of relationships among the isolated *Frankia* (Actinomycetales). *Int J Syst Bacteriol* 31:148-151.
7. Baker, D. D. 1987 Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol Plant* 70:245-248.
8. Becking, J. H. 1970. *Frankiaceae* fam. Nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886. *Int J System Bacteriol* 20:201-220.
9. Benoist, P. & J. Schwencke. 1990. Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase and esterase activities at the nanogram level: enzymatic patterns in some *Frankia* strains. *Ann Biochem* 187:37-44.
10. Benson, D.R., D.J. Arp & R.H. Burris. 1980. Cell free nitrogenase and hydrogenase from actinorhizal root nodules. *Science* 205:688-689.
11. Benson, D.R., S.E. Buchholz & D. G. Hanna. 1984. Identification of *Frankia* strains by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
12. Benson, D.R., D.W. Stephens, M. L. Clawson & W.B. Silvester. 1996. Amplification of 16S rDNA genes from *Frankia* in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumose*, *Discaria toumatou* and *Purshia tridentata*. *Appl Environ Microbiol* 62:2904-2909.
13. Benson D. R., B.D. Vanden Heuvel & D. Potter. 2004 Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography. *BIOS Sc* 15:99-130.
14. Benson D. R. & J. O. Dawson. 2007. Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. *Physiol Plant* 130:318-330.
15. Berry, A. M., R. A. Moreau & A. D. Jones. 1991. Bacteriohopanetetrol: abundant lipid in *Frankia* cells and in nitrogen-fixing nodule tissue. *Plant Physiol* 95:111-115.
16. Berry A., O. Harriott., R. Moreau., S. Osman., D. Benson & A. Jones. 1993. Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc Nat Acad Sci* 90:609-6094.
17. Bosco M., M. P. Fernandez., P. Simonet., P. Materassi & P. Normand. 1992. Evidence that some *Frankia* sp strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* Host Specificity Groups. *Appl Environ Microbiol* 58:1569-1576.
18. Busse M. D. 2000. Ecological significance of nitrogen fixation by actinorhizal shrubs in interior forests of California and Oregon. USDA Forest Service Gen Tech Rep PSW-GTR-178.
19. Callaham D., P. Del Tredecia & J. G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199:899-902.
20. Clawson M. L., M. Carú & 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.
21. Clawson M. L. & D. R. Benson. 1999. Natural diversity of *Frankia* strains in actinorhizal root nodules from promiscuous hosts in the family Myricaceae. *Appl Environ Microbiol* 65:4521-7.
22. Clawson M. L., A. Bourret & D. R. Benson. 2004. Assessing the phylogeny of *Frankia*-actinorhizal plant nitrogen-fixing root nodule symbioses with *Frankia* 16S rRNA and glutamine synthetase gene sequences. *Mol Phylogeny Evol* 31:131-8.
23. Cournoyer, B. & P. Normand. 1994. Characterization of a spontaneous thiostrepton-resistant *Frankia alni* infective isolate using PCR-RFLP of *nif* and *glnII* genes. *Soil Biol Biochem* 26:553-559.
24. Cournoyer B. & C. Lavire. 1999. Analysis of *Frankia* evolutionary radiation using *glnII* sequences. *FEMS Microbiol Lett* 177:29-34.
25. Dawson, J. O. 1990. Interactions among actinorhizal and associated plant species. pp 299-316. In C R Schwintzer & J D Tjepkema (Eds). *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, San Diego, California.
26. Diem, H. G., & Y. R. Dommergues. 1990. Current and potential uses and management of Casuarinaceae in the tropics and subtropics. pp 317-342. In C R Schwintzer & J D Tjepkema (Eds). *The biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, San Diego, California.
27. Dixon R., S. Austin., T. Eydmann., S. Hill., S.O. Kim., P. Macheroux., R. Poole., F. Reyes., Sobczyk & E. Soderback. 1998. Regulation of *nif* gene expression in free living diazotrophs: Recent advances. pp. 87-91. In H. Bothe, F.J. DeBruijn & W.E. Newton (Eds). *Nitrogen Fixation: hundred years after*, Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
28. Dommergues Y. R. 1997. Contribution of actinorhizal plants to tropical soil productivity and rehabilitation. *Soil Biol Biochem* 29:931-941

29. Dommergues Y. R. & N. S. Subba Rao. 2000. Introduction of N₂-fixing trees in non-N₂-fixing tropical plantations. pp 131-154. In N S Subba Rao & Y R Dommergues (Eds). Microbial interactions in agriculture and forestry, Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
30. Edmands J., N. A. Noridge & D. R. Benson. 1987. The actinorhizal root-nodule symbiont *Frankia* sp strain Cpll has two glutamine synthetases. *Proc Natl Acad Sci.* 84:6126-6130.
31. Fernandez M. P., H. Meugnier., P. A. D. Grimont & R. Bardin. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int J Syst Bacteriol* 39:424-429.
32. Gardes M., J. Bousquet & M. Lalonde. 1987. Isozyme Variation among 40 *Frankia* strains. *Appl Environ Microbiol* 53:1596-1603.
33. Gauthier D., T. Jaffre & Y. Prin. 1999. Occurrence of both *Casuarina*-infective and *Elaeagnus*-infective *Frankia* strains within actinorhizae of *Casuarina collina* endemic to New Caledonia. *Eur J Soil Biol* 35:9-15.
34. Gauthier, D., T. Jaffre & Y. Prin. 2000 Abundance of *Frankia* from *Gymnostoma* spp in the rhizosphere of *Alphitonia neocaledonica*, a non-nodulated Rhamnaceae endemic to New Caledonia. *Eur J Soil Biol* 36:169-175
35. Gevers D., F. M. Cohan., J. G. Lawrence., B. G. Spratt., T. Coenye., E. J. Feil., E. Stackebrandt., Y. Van de Peer., P. Vandamme., F. L. Thompson & J. Swigs. 2005 Re-evaluating bacterial species. *Nat Microbiol. Rev* 3:733-739.
36. Girgis, M. G. Z. & J. Schwencke. 1993. Differentiation of *Frankia* strains by their electrophoretic patterns of intracellular esterases and aminopeptidases. *J Gen Microbiol* 139:2225-2232.
37. Gtari M., D. Daffonchio & A. Boudabous. 2007. Occurrence and diversity of *Frankia* in Tunisian Soil. *Physiol Plant* 130:372-379.
38. Gualteri G. & T. Bisseling. 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol* 42:181-194.
39. Gurtler, V. 1999. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer. *Gene* 238:241-252.
40. Hahn D. 2008. Polyphasic taxonomy of the genus *Frankia*. In K Pawlowsky & W E Newton (Eds). Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbiosis, Kluwer Academic Publishers.
41. Hahn D., M. P. Lechevalier., A. Fischer & E. Stackebrandt. 1989. Evidence for a close phylogenetic relationship between members of the genera *Frankia*, *Geodermatophilus*, "*Blastococcus*" and emendation of the family *Frankiaceae*. *Syst Applied Microbio* 11:236-242.
42. Hahn D., A. Nikel & J. Dawson. 1999. Assessing *Frankia* populations in plants and soil using molecular methods. *FEMS Microbiol Ecol* 29:215-227.
43. Hanage W. P., C. Fraser & B. Spratt. 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Phil Trans R Soc B* 361:1917-1927.
44. Harry D. E., D. C. Yang & J. O. Dawson. 1991. Nucleotide sequence and diversity in 16S ribosomal RNA from *Frankia*. *Plant and Soil* 131:143-146.
45. Horrière F. 1984. In vitro physiological approach to classification of *Frankia* isolates of 'the *Alnus* group', based on urease, protease and β -glucosidase activities. *Plant Soil* 74:7-13.
46. Huguet V., J. McCray Batzli., J. F. Zimpfer., P. Normand., J. O. Dawson & 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* 67:2116-2122.
47. Huss Danell, K. 1997. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytol* 136:375-405.
48. Jae O. C. & K. C. S. An Ho Bang. 2003. Molecular cloning and complementation analysis of *nifV* gene from *Frankia* EuIK1 strain. *Mol Cells* 15:27-33.
49. Jamann, S., M. P. Fernandez & 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.
50. Jeong, S.-C. & D. D. Myrold. 1999. Genomic fingerprinting of *Frankia* microsymbionts from *Ceanothus* copopulations using repetitive sequences and polymerase chain reactions. *Can J Bot* 77:1220-1230.
51. Jeong, S. C., N. J. Ritchie & D. D. Myrold. 1999. Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. *Mol Phylogen Evol* 13:493-503.
52. Jeong, S. C. & D. D. Myrold. 2001. Population size and diversity of *Frankia* in soils of *Ceanothus velutinus* and Douglas-fir stands. *Soil Biol Biochem* 33:931-941.
53. John, T.R., J. M. Rice & J. D. Johnson. 2001 Analysis of pFQ12, a 22.4-kb *Frankia* plasmid. *Can J Microbiol* 47:608-617.
54. John T. R., J. Wigginton., J. Bock., R. Klemt & J. D. Johnson. 2004. An insertion sequence unique to *Frankia* Ar15. *Plant Soil* 254:107-113.
55. Kazazian H. H. 2004. Mobile elements drivers of genome evolution. *Science* 303:1626-1632.
56. Kim, H.B. & C. S. An. 1997. Nucleotide sequence and expression of *nifHD* from *Frankia* strain EuIK1, a symbiont of *Elaeagnus umbellata*. *Physiol Plant* 99:690-695.
57. Kumada Y., D. R. Benson., D. Hillemann., T. J. Hosted., D. A. Rochefort., C. Thompson., W. Wohlleben & Y. Tateno. 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene: one of the oldest genes ever studied. *Proc Nat Acad Sci.* 90:3009-3013.
58. Lalonde M., L. Simon., J. Bousquet & A. Seguin. 1988. Advances in the taxonomy of *Frankia*: recognition of species *Alni*, *elaegnii* and novel subspecies *pommeri* and *vandijkii*. pp 671-680. In H. Bothe, F.J. DeBruijn & W.E. Newton (Eds). Nitrogen Fixation: hundred years after, Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
59. Lavire C., D. Louis., G. Perriere., J. Briolay., P. Normand & B. Cournoyer. 2001. Analysis of pFQ31, a 8551-bp cryptic plasmid from three symbiotic nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. *FEMS Microbiol Lett* 197:111-116.
60. Lavire C. & B. Cournoyer. 2003. Progress on the genetics of the N₂ fixing actinorhizal symbiont *Frankia*. pp 125-137. In P. Normand, K. Pawlowsky & J. O. Dawson. *Frankia* Symbiosis: Proc 12th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal Plants, Kluwer Academic Publishers.
61. Lechevalier, M.P. 1983. Cataloging *Frankia* strains. *Can J Microbiol* 61: 2964-2967.
62. Lechevalier, M.P. 1984. The taxonomy of the genus *Frankia*. *Plant and soil* 78:1-6.
63. Lechevalier, M. P. 1994. Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales). *Int J Syst Bacteriol* 44:1-8.
64. Lechevalier, M.P. & H. A. Lechevalier. 1984. Taxonomy of *Frankia*. pp. 2410-2417. In S T Williams, M E Sharpe and J G: Holt (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol 4, The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
65. Lee H., S. B. Sung., H.B. Kim & C. S. An. 2001. Sequence analysis and expression patterns of two *nifA* genes from *Frankia* EuIK1. *Aust J Plant Physiol* 28: 939-949.
66. Leul M., P. Normand & A. Sellstedt. 2007. The organization, regulation and phylogeny of uptake hydrogenase genes in *Frankia*. *Physiol Plant* 130:464-470.
67. Ligon M. J & James P. Nakas. 1987. Isolation and characterization of *Frankia* sp strain FaCl genes Involved in nitrogen fixation. *Appl Environ Microbiol* 53:2321-2327.

68. Lumini E. & M. Bosco. 1996. PCR-restriction fragment length polymorphism identification and host range of single-spore isolates of the flexible *Frankia* sp strain UFI 132715. *Appl Environ Microbiol* 62:3026-3029.
69. Maggia L. & J. Bousquet. 1994. Molecular phylogeny of the actinorhizal Hamamelidae and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Mol Ecol* 3:459-467.
70. Maréchal J., B. Clement., R. Nalin., G. Corinne., S. Orso., J. Cvejic., M. Bruneteau., A. Berry & Philippe Normand. 2000. A recA gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *Int J Syst Bacteriol* 50: 781-785.
71. Martinez-Argudo I., R. Little., N. Shearer., P. Johnson & R. Dixon. 2004. The nifL-nifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *J Bacteriol* 186:601-610.
72. Mattsson U. & Anita Sellstedt. 2000. Hydrogenase in *Frankia* KB5: expression of and relation. *Rev Canad Microbiol* 46:91-95.
73. Mirza S., D. Hahn & A. D. L. Akkermans. 1992. Isolation and characterization of *Frankia* strains from *Coriaria nepalensis*. *Syst Appl Microbiol* 15:289-295.
74. Mirza S. M., S. Hammed & Antoon D. L Akkermans. 1994. Genetic diversity of *Datisca cannabina*-compatible *Frankia* strains as determined by sequence analysis of the PCR-amplified 16S rRNA gene. *Appl Environ Microbiol* 60:2371-2376.
75. Mort A., P. Normand & M. Lalonde. 1983. 2-O-Methyl-D-Mannose, a key sugar in the taxonomy of *Frankia*. *Can J Microbiol* 29:993-1002.
76. Murry, M. A., A. S. Konopka, S. D. Pratt, & T. L. Vendergon. 1997. The use of PCR-based typing methods to assess the diversity of *Frankia* nodule endophytes of the actinorhizal shrub *Ceanothus*. *Physiol Plant* 99:714-721.
77. Murry M. A., D. Zhang., M. Schneider & F. J. de Bruijn. 1995. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction (rep-PCR) to fingerprint the genomes of *Frankia* isolates. *Symbiosis* 19:223-240.
78. Myrold D. D. & K. Huss-Danell. 1994. Population dynamics of *Alnus*-infective *Frankia* in a forest soil with and without host trees. *Soil Biol Biochem* 26:533-540.
79. Nalin R., A. M. Domenach & P. Normand. 1995. Molecular structure of the *Frankia* sp nifD-K intergenic spacer and design of *Frankia* genus compatible primer. *Mol Ecol* 4:483-91.
80. Nasr H., A. M. Domenach., M. H. Ghorbel & D. R. Benson. 2007. Divergence in symbiotic interactions between same genotypic PCR-RFLP *Frankia* strains and different Casuarinaceae species under natural conditions. *Physiol Plant* 130:400-408.
81. Navarro E., T. Jaffre., D. Gauthier., F. Gourbière., G. Rinaudo., P. Simonet & P. Normand. 1999. Distribution of *Gymnostoma* sp microsymbiotic *Frankia* strains in New Caledonia is related to soil type and to host-plant species. *Mol Ecol* 8:1781-1788.
82. Navarro E., R. Nalin., D. Gauthier & P. Normand. 1997. The nodular microsymbionts of *Gymnostoma* sp are *Elaeagnus*-infective *Frankia* strains. *Appl Environ Microbiol* 63:1610-1616.
83. Nazaret S., B. Cournoyer., P. Normand & P. Simonet. 1991. Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J Bacteriol* 173:4072-4078.
84. Newcomb W., D. Callaham., J. G. Torrey & R. L. Peterson. 1979. Morphogenesis and fine structure of the actinomycetous endophyte of nitrogen-fixing root nodules of *Comptonia peregrina*. *Bot Gaz* 140:S22-S34.
85. Nikel A., O. Pelz., D. Hahn., M. Saurer., R. Siegwolf & J. Zeyer. 2001. Effect of inoculation and leaf litter amendment on establishment of nodule-forming *Frankia* populations in soil. *Appl Environ Microbiol* 67:2603-2609.
86. Normand P., P. Simonet., J. L. Butour., C. H. Rosenberg., A. Moiroud & M. Lalonde. 1983. Plasmids in *Frankia* sp. *J Bacteriol* 155:32-35.
87. Normand P & J. Bousquet. 1989. Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. *J Mol Evol* 29:436-447.
88. Normand P., M. Gouy., B. Cournoyer & P. Simonet. 1992. Nucleotide sequence of nifD from *Frankia alni* strain ArI3: Phylogenetic inferences. *Mol Biol Evol* 9:495-506.
89. Normand P., S. Orso., B. Cournoyer., P. Jeannin., C. Chapelon., J. Dawson., L. Evtushenko & 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.
90. Normand P., P. Lapierre., L. S. Tisa., J. P. Gogarten., N. Alloisio., E. Bagnarol., C. A. Bassi., A. M. Berry., D. M. Bickhart., N. Choisine., A. Couloux., B. Cournoyer., S. Cruveiller., V. Daubin., N. Demange., M. P. Francino., E. Goltsman., Y. Huang., O. R. Kopp., L. Labarre., A. Lapidus., C. Lavire., J. Maréchal., M. Martinez., J. E. Mastrorunzio., B. C. Mullin., J. Niemann., P. Pujic., T. Rawnsley., Z. Rouy., C. Schenowitz., A. Sellstedt., F. Tavares., J. Tomkins., D. Vallenet., C. Valverde., L. G. Wall., Y. Wang., C. Médigue & D. R. Benson. 2007a. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* 17: 7-15.
91. Normand P., C. Queiroux., L. S. Tisa., D. R. Benson., Z. Rouy., S. Cruveiller & C. Médigue. 2007b. Exploring the genomes of *Frankia*. *Physiol Plant* 130:331-343.
92. Paschke M., J. O. Dawson & M.B. David. 1989. Soil nitrogen mineralization in plantations of *Juglans nigra* interplanted with *Elaeagnus umbellata* or *Alnus glutinosa*. *Plant Soil* 118:33-42.
93. Paschke M. & J. Dawson. 1992. *Frankia* abundance in soils beneath *Betula nigra* and other non-actinorhizal woody plants. *Acta Oecol* 13:407-415.
94. Pawlowski K & T. Bisseling. 1996. Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features?. *Plant Cell* 8:1899-1913.
95. Pérez N. O., H. Olivera & M. Valdés. 1999. Genetic characterization of Mexican *Frankia* strains nodulating *Casuarina equisetifolia*. *Can J Botany* 77:1214-1219.
96. Ramirez-Saad H., J. D. Janse & A. D. L. Akkermans. 1998. Root nodules of *Ceanothus caeruleus* contain both the N₂-fixing *Frankia* endophyte and a phylogenetically related Nod-/Fix- actinomycete. *Can J Microbiol* 44:140-148.
97. Rawnsley T. & L.S. Tisa. 2007. Development of a physical map for three *Frankia* strains and a partial map for *Frankia* Eu11c. *Physiol Plant* 130:427-439.
98. Rees D. C., C. Shindelin., J. Kisker., J. W. Schlessman., L. C. Peters., Seefeldt & J. B. Howard. 1998. Complex Structures of Nitrogenase p: 11-16 In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers.
99. Ritchie N. J. & D. D. Myrold. 1999. Geographic distribution and genetic diversity of *Ceanothus*-infective *Frankia* strains. *Appl Environ Microbiol* 65:1378-1383.
100. Robertson D.L. & A. Tartar. 2006. Evolution of glutamine synthetase in heterokonts: Evidence for endosymbiotic gene transfer and the early evolution of photosynthesis. *Mol Biol Evol* 23:1048-1055.
101. Rosa-Putra S., R. Nalin., A. M. Domenach & M. Rorhner. 2001. Novel hopanoids from *Frankia* and related soil bacteria. *Eu J Biochem* 268: 4300-4306.
102. Rouvier C., S. Nazaret., M. P. Fernandez., B. Picard., P. Simonet & P. Normand. 1992. *rrn* and *nif* intergenic spacers, and isoenzyme patterns as tools to characterize *Casuarina*-infective *Frankia* strains. *Acta Oecol* 13:487-495.

103. Rouvier C., Y. Prin., P. Reddell., P. Normand & P. Simonet. 1996. Genetic diversity among *Frankia* strains nodulating members of the family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules. *Appl Environ Microbiol* 62:979-985.
104. Roy A. & J. Bousquet. 1996. The evolution of the actinorhizal symbiosis through phylogenetic analysis of host plants. *Acta Bot Gallica* 143:635-650.
105. Ruvkun G. B. & F. M. Ausbel. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci* 77:191-195.
106. Sayed W. F. 2003. Effects of land irrigation with partially-treated wastewater on *Frankia* survival and infectivity. pp 19-26. In P. Normand, K. Pawlowsky & J. O. Dawson (Eds). *Frankia Symbiosis: Proc 12th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants*, Kluwer Academic Publishers.
107. Schwencke J. & M. Carú. 2001. Advances in Actinorhizal Symbiosis: host plant- *Frankia* interactions, Biology and Applications in Arid Land Reclamation. A review. *Arid Land Res Manage* 15:285 – 327.
108. Sellstedt A. & P. Lindblad. 1990. Activities, occurrence, and localization of hydrogenase in free-living and symbiotic *Frankia*. *Plant Physiol* 92:809-815.
109. Silvester W.B., J.K. Silvester & J. G. Torrey. 1988. Adaptation of nitrogenase to varying oxygen tension and the role of the vesicle in the root nodules of *Alnus incana* ssp. *rugosa*. *Can J Bot* 66:1772-1779.
110. Simon L., S. Jabaji-Hare., J. Bousquet & M. Lalonde. 1989. Confirmation of *Frankia* species using cellular fatty acids analysis. *Syst Appl Microbiol* 11:229-235.
111. Simonet P., P. Normand., A. Moiroud & M. Lalonde. 1985. Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids. *Plant Soil* 87:49-60.
112. Simonet P., J. Haurat., P. Normand., R. Bardin & A. Moiroud. 1986. Localization of *nif* genes on a large plasmid in *Frankia* sp strain ULQ0132105009. *Mol Gen Genetics* 204: 492-495.
113. Simonet P., P. Normand & R. Bardin. 1988. Heterologous hybridization of *Frankia* DNA to *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nif* genes. *FEMS Microbiol Lett* 55 :141-146.
114. Simonet P., E. Navarro., C. Rouvier., P. Reddell., J. Zimpfer., Y. Dommergues., R. Bardin., P. Combarro., J. Hamelin., A.-M. Domenach., F. Gourbiere., Y. Prin., J. O. Dawson & P. Normand. 1999. Co-evolution between *Frankia* populations and host plants in the family Casuarinaceae and consequent patterns of global dispersal. *Environ Microbiol* 1:525-533.
115. Smolander, A. & V. Sundman. 1987. *Frankia* in acid soils of forest devoid of actinorhizal plants. *Physiol Plantarum* 70:297-303.
116. Soltis, D.E., Soltis, P.S., M.W. Chase, M.E. Mort, D.C. Albach, M. Zanis, V. Savolainen, W.H. Hahn, S.B. Hoot, M.F. Fay, M. Axtell, S.M. Swensen, L.M. Princel, W.J.O.H.N. Kress, K.C. Nixon, J.S. Farris. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. *Bot J Linn Soc* 133:381-461.
117. Soltis D. E., P. S. Soltis., D. R. Morgan., S. M. Swensen., B. C. Mullin., J. M. Dowd & P. G. Martin. 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci* 92:2647-2651.
118. St. Laurent L., J. Bousquet., L. Simon & M. Lalonde. 1987. Separation of various *Frankia* strains in the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. *Can J Microbiol* 33:764-772.
119. Stackebrandt E., W. Frederiksen., G. M. Garrity., PAD Grimon., P. Kampfer., MCJ. Maiden., X. Nesme., Rossello-Mora R., J. Swings., H. G. Truper., L. Vauterin., A. C. Ward & W. B. Whitman. 2002. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J of Syst Evol Microbiol* 52:1043-1047.
120. Swensen, S. M. 1996 The evolution of actinorhizal symbioses: Evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am J Bot* 83:1503-1512.
121. Swensen S. M., B. C. Mullin & M. W. Chase. 1994. Phylogenetic affinities of the Datisceae based on an analysis of nucleotide sequences from the plastid *rbcL* gene. *Syst Bot* 19:157-168.
122. Swensen S. M. & David R. Benson. 2008. Evolution of actinorhizal host plants and *Frankia* endosymbionts. pp 2-33. In K. Pawlowsky & W. E. Newton (Eds). *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbiosis*, Kluwer Academic Publishers.
123. Tjepkema, J. D., & J. G. Torrey. 1979. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants. *Bot Gazette* 140:i-ii.
124. Tjepkema, J. D., W. Ormerod & J.G. Torrey. 1981. Factors affecting vesicle formation and acetylene reduction (nitrogenase activity) in *Frankia* CpI4. *Can J Microbiol* 27:815-823.
125. Torrey, J. G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience* 28:586-592.
126. Torrey, J. G. 1985. The site of nitrogenase in *Frankia* in free-living culture and in symbiosis. In pp. 293-299. H. J. Evans, P. J. Bottomley & W. E. Newton (Eds). *Nitrogen fixation research progress*. Martinus Nijhof, Dordrecht The Netherlands.
127. Trujillo Cabrera, Y. 2007. Diversidad genética de *Frankia* en el interior de los nódulos de Casuarina en México. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.
128. Tsai Y. L. & D. R. Benson. 1989. Physiological characteristics of glutamine synthetases I and II of *Frankia* sp strain CpI1. *Arch Microbiol* 152:382-386.
129. Valdés M. 2008. *Frankia* Ecology. pp. In K. Pawlowsky & W. E. Newton (Eds). *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbiosis*, Kluwer Academic Publishers.
130. Valdés, M., L. Vásquez, N.O. Pérez. 2001. Genetic markers (RAPDs and repPCR) for ecological studies of the nitrogen-fixing symbiosis *Frankia*-Casuarina. *European Trop For Res Network* 341:27-29.
131. Vanden Heuvel B. D., R. D. Benson., E. Bortiri., M. Valdés M. & Daniel Potter. 2004. Low genetic diversity among *Frankia* sp Strains nodulating sympatric populations of actinorhizal species of Rosaceae, *Ceanothus* (Rhamnaceae) and *Datisca glomerata* (Datisceae) west of the Sierra Nevada (California). *Can J Microbiol* 50:989-1000.
132. Verghese & A. K. Misra. 2002. *Frankia*-actinorhizal symbiosis with special reference to host-microsymbiont relationship. *Current Science* 83: 404-407.
133. Wall L. G. 2000. The actinorhizal symbiosis. *J Plant Growth Regul* 19: 167-182.
134. Xu X. D., R. Q. Kong., de Bruijn F.J., S. Y. He., M. A. Murry., T. Newman & P. Wolk. 2002. DNA sequence and genetic characterization of plasmid pFQ11 from *Frankia alni* strain CpI1. *FEMS Microbiol. Lett.* 207:103107.

Correspondencia:

María Valdés

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
 Instituto Politécnico Nacional,
 Plan de Ayala y Carpio, 11340 México D.F.
 Tel. 5729-6208
 Fax 5729-6207
 E-mail mvaldesr@ipn.mx