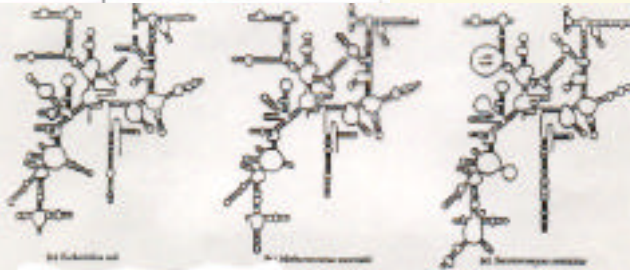
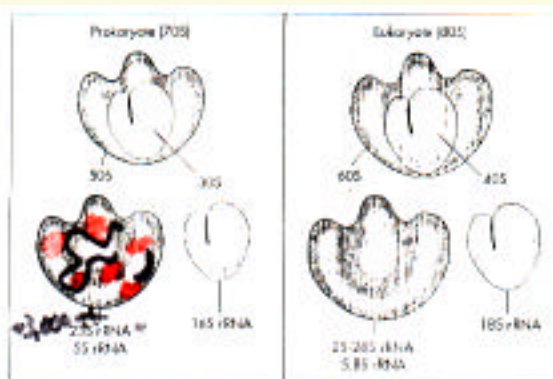


Análisis Filogenético

16S ARN Ribosomal

- ✓ Función universal
- ✓ Distribución universal
- ✓ Estimado: 1-2% variación en la secuencia cada 50 millones de años
- ✓ Fácil de aislar y caracterizar
- ✓ Estructura secundaria conocida
- ✓ Regiones conservadas y otras variables
- ✓ Secuencia comparable con otros organismos
- ✓ Banco de datos (RDP, ribosomal data project); www.cme.msu.edu/rdp/html/index.html



Metodología

Organismo

Aislación DNA cromosomal

Aislación de DNA ribosomal (PCR)

Secuenciación DNA

Aliniación con Banco de Datos

Análisis

Representación: Arbol Filogenético

Resultados: (características de un cronómetro evolutivo)

- ✓ Posición evolutiva relativa (distancia evolutiva).
- ✓ Tres linajes distintivos (2 Prokarióticos/1 Eucariótico)
Arquea, Bacteria & Eucaria.
- ✓ La raíz del árbol de la vida representa una forma ancestral común.
- ✓ *Arquea & Eucaria* son evolutivamente más relacionados.
- ✓ Las *Arqueas* están evolutivamente más cercanas a la forma ancestral (más primitivos).
- ✓ Eucariotas están más distanciados de la forma ancestral (menos primitivos).
- ✓ Origen termofílico de los seres orgánicos.

Tres SUPERDOMINIOS (superREINOS):

✓ **Arquea:**

- **Crenarqueota** (hipertermofílicas/acidofílicas)
- **Euryarqueota** (termofílicas, metanogénicas y halófilas)
- **Korarqueota** (no-cultivables hasta el momento)

✓ **Bacteria:**

- 12 lineajes distintivos

✓ **Eucaria:**

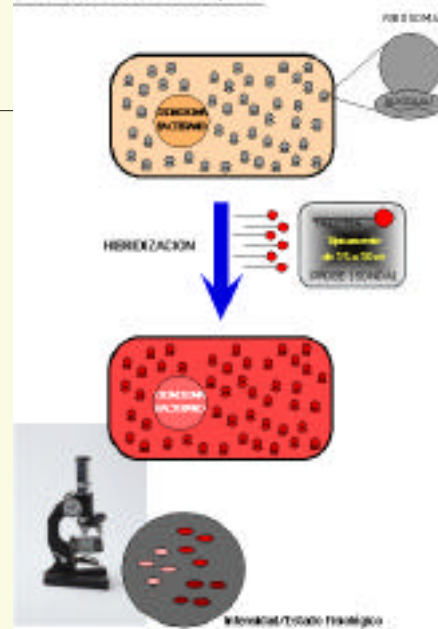
- **Protistas**
- **Hongos**
- **Plantas**
- **Animales**

Características	Bacteria	Arquea	Eucaria
Estructura celular prokariótica	Sí	Sí	No
DNA circular	Sí	Sí	No
Núcleo rodeado por membranas	No	No	Sí
Pared celular	Mureína	No-mureína	No-mureína
Lípidos de la membrana	Ester	Eter	Ester
Ácidos grasos membrana	Lineal	Ramificados	Lineal
Ribosomas	70S	70S	80S & 70S
Iniciador tRNA	Formil-metionina	Metionina	Metionina
Intrones en los genes de tRNA	No	Sí	Sí
Intrones en la mayoría de genes	No	No	Sí
Operones	Sí	Sí	No
Plásmidos	Sí	Sí	Raros
Ribosomas sensibles a toxina difteria	No	Sí	Sí
Sensibilidad: cloroamfenicol, kanamicina y estreptomycin	Sí	No	No
Metanogénesis	No	Sí	No
Reducción de S ⁰ a H ₂ S	Sí	Sí	No
Nitrificación	Sí	No	No
Denitrificación	Sí	Sí	No
Fijación de nitrógeno	Sí	Sí	No
Fotosíntesis vía clorofilas	Sí	No	Sí
Quimiolitotrofia	Sí	Sí	No
Vesículas de gas	Sí	Sí	No

Análisis de ARN ribosomal:

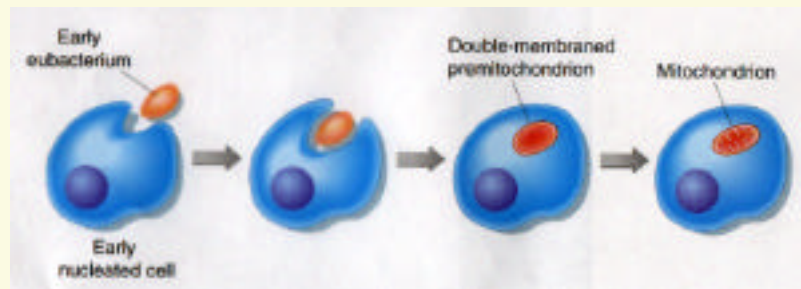
- ✓ Clasificación
- ✓ Identificación *in-situ* de microorganismos
- ✓ Estado fisiológico (basado en contenido de ribosomas por célula)
- ✓ Estudio de organismos no-cultivables
- ✓ Estudio de comunidades

TINCIÓN FILOGENÉTICA



Evolución Microbiana

- ✓ Origen de la Tierra
- ✓ Récord Fósil
- ✓ Evolución Química
- ✓ Evolución Celular
- ✓ Hipótesis de GAIA
- ✓ Origen de organelos (Eucaria)
- ✓ **Teoría del Endosimbionte**



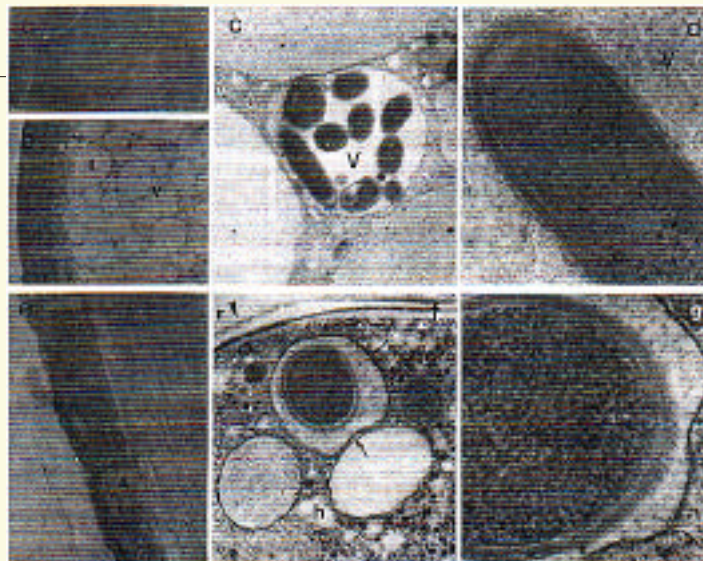
An Obligately Endosymbiotic Mycorrhizal Fungus Itself Harbors Obligately Intracellular Bacteria

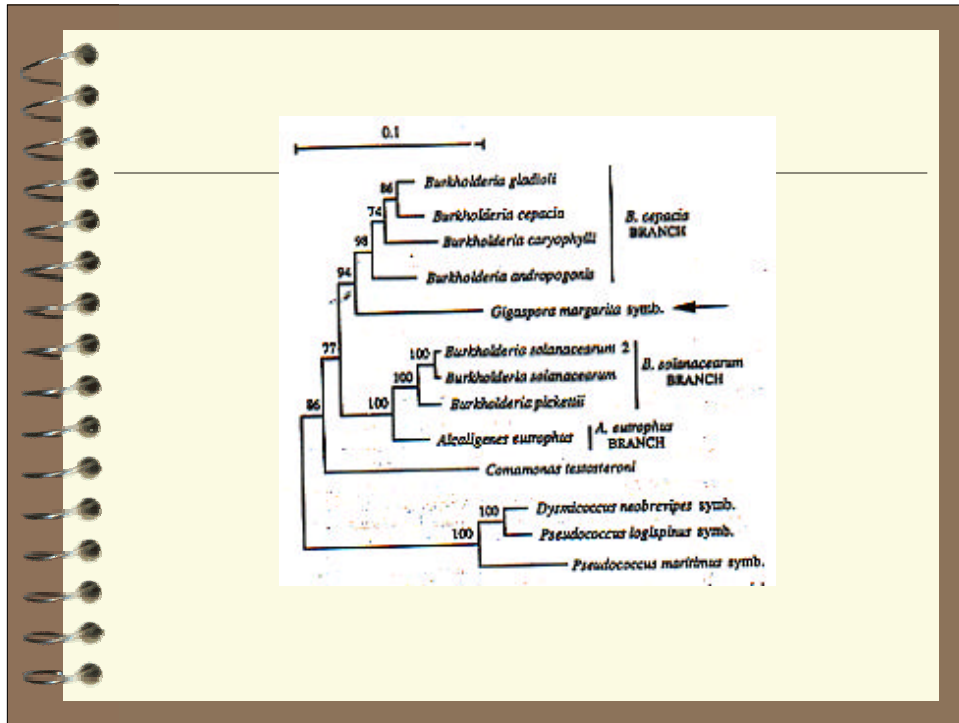
VALERIA BIANCIOTTO,¹ CLAUDIO BANDI,^{1*} DANIELA MINERDI,¹ MASSIMO SIRONI,¹
HANS VOLKER TIBBY,² AND PAOLA BONFANTE^{1*}

Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Torino and Centro di Studio sulle Micorrizhe del Tesoro
del Consiglio Nazionale delle Ricerche, 10125 Torino,¹ Istituto di Fisiologia Generale e Fisiologia
dell'Università di Milano, 20133 Milano,² and Dipartimento di Genetica e Microbiologia
dell'Università di Pavia, 27100 Pavia,³ Italy, and Fachgruppe Biologische Zoologie,
TUV Braunschweig and Umwelt ChemE, 75330 Fallingb., Germany⁴

Received 15 January 1994/Accepted 3 May 1994

Arbuscular-mycorrhizal fungi are obligate endosymbionts that colonize the roots of almost 80% of land plants. This paper describes the employment of a combined morphological and molecular approach to demonstrate that the spores of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* harbors a further bacterial endosymbiont. Intracytoplasmic bacterial-like organelles (BLOs) were detected ultrastructurally in its spores and germinating and symbiotic apices. Morphological observations with a fluorescent stain revealed about 100,000 live bacteria inside each spore. The sequences for the small-subunit rDNA genes obtained for the BLOs from the spores was compared with those for representatives of the suborder *Thomopsales*. Molecular phylogenetic analysis unequivocally showed that the endosymbiont of *G. margarita* was an rDNA group II *paenibacillus* (genus *Rhizobium*). PCR assays with specifically designed oligonucleotides were used to check that the sequences came from the BLOs. Successful amplification was obtained when templates from both the spores and the symbiotic apices were used. A band of the expected length was also obtained from spores of a *Sonchispiza* sp. No bands were given by the negative controls. These findings indicate that symbiotic spores can include plant, fungal, and bacterial cells.





¿Por qué es importante reconocer la biodiversidad microbiana?

- ✓ Rol crítico de los microorganismos en ciclos biogeoquímicos
- ✓ Presentes en la Tierra hace mucho tiempo
- ✓ Importancia en aspectos clínicos, industriales y aspectos de tratamiento de desperdicios
- ✓ Indicadores de condiciones ambientales
- ✓ Potencial biotecnología

¿Cuanto conocemos de diversidad microbiana?

- ✓ Antes pensabamos que con cultivos puros conocíamos a la gran mayoría de los microorganismos.
- ✓ 1980's, quizás conocemos un 10% de la diversidad total.
- ✓ 1990's, quizás conocemos un 1% de la diversidad total.
- ✓ Siglo XXI, quizás conocemos un 0.1% de la diversidad total.

Evidencias:

- ✓ Tendencia en la descripción de nuevos géneros y especies.
- ✓ Relación tamaño vs. diversidad (a menor tamaño comportal, mayor número de especies).
- ✓ ¿Correlacionan cepas ambientales con bancos de datos?
- ✓ Enumeración directa vs. métodos indirectos en suelo (10^9 vs 10^7 por g).
- ✓ Coeficiente de reasociación del DNA (Cot value, Trosvik et al.).
- ✓ 16S RNA ribosomal.