

# **Aplicación de perfiles moleculares de la comunidad microbiana para la identificación de microorganismos asociados a la supresión de enfermedades de suelos**

**María Soledad Benítez**  
**Quito, 2008**



## Brian McSpadden Gardener

<http://www.oardc.ohio-state.edu/mcspaddengardenerlab/>

**Sally Miller**

**Matthew Kleinhenz**



# Suelos supresores de patógenos de plantas

**Definición:** suelos en los cuáles los patógenos no se desarrollan, no causan enfermedad o la enfermedad disminuye con el tiempo

## Mecanismos

- **Supresión específica:** causada por microorganismos antagonistas del patógeno
- **Supresión general:** causada por la actividad colectiva de los microorganismos en el suelo

Baker y Cook, 1974

# Identificación de microorganismos asociados con la supresión

- 1. Identificación de un gradiente de supresión**
- 2. Asociación estadística de miembros de la comunidad microbiana (marcadores moleculares) con la supresión**
- 3. Identificación y aislamiento de microorganismos en base a presencia de marcadores moleculares**
- 4. Caracterización de la capacidad de supresión por parte de las poblaciones aisladas**

Modificado de Borneman et al 2007 *Manual Env Microbiol 3rd Ed.*

# Identificación de un gradiente de supresión

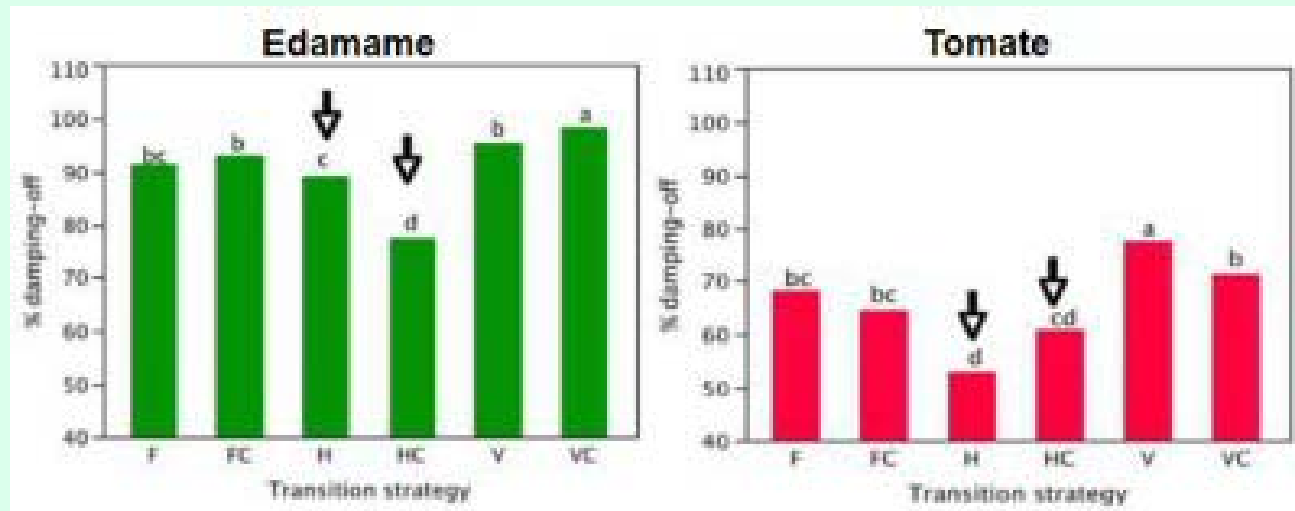
**Estudio del impacto de distintos tipos de manejo del suelo utilizados durante la transición de agricultura convencional a agricultura orgánica (2003-2006)**

- **Suelo en descanso**
  - **Cultivo de vegetales**
  - **Cultivo perenne de pastos**
- ± Compost**

# Hipótesis

- Los suelos expuestos a una mayor diversidad vegetal (pastos) son supresores de enfermedades del suelo (mortalidad de plántulas)
  - **Beneficios de abonos verdes y cultivos de cereales y leguminosas en el suelo y la comunidad microbiana (Faguera 2005; Seiges and Pritts 2006; Shutter and Dick 2002)**
  - **Cultivos más diversos poseen mayor biomasa y actividad microbiana (Zak et al 2003)**
  - **Cultivos mixtos presentan menores índices de enfermedades (Vilich 1993; Mundt 2002)**

# Identificación de suelos con varios niveles de supresión



Modificado de Baysal et al. 2008

**Suelos de cultivo perenne de pastos supresores de mortandad de plántulas de edamame y tomate en múltiples experimentos**

# Identificación de microorganismos asociados con la supresión

1. Identificación de un gradiente de supresión
- 2. Asociación estadística de miembros de la comunidad microbiana (marcadores moleculares) con la supresión**
3. Identificación y aislamiento de microorganismos en base a presencia de marcadores moleculares
4. Caracterización de la capacidad de supresión por parte de las poblaciones aisladas

Modificado de Borneman et al. 2007 *Manual Env Microbiol 3rd Ed.*



# Estudio de la comunidad microbiana

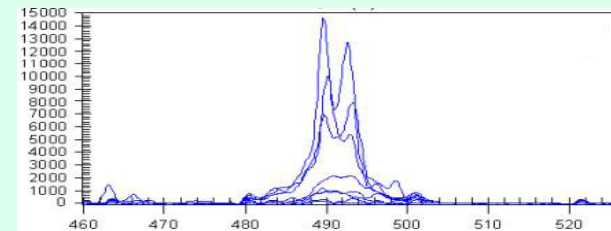
**T**erminal **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism  
de 16S rADN (bacterias) e ITS (hongos y oomicetos)



Muestras de suelos y raíces



extracción de ADN,  
amplificación y digestión

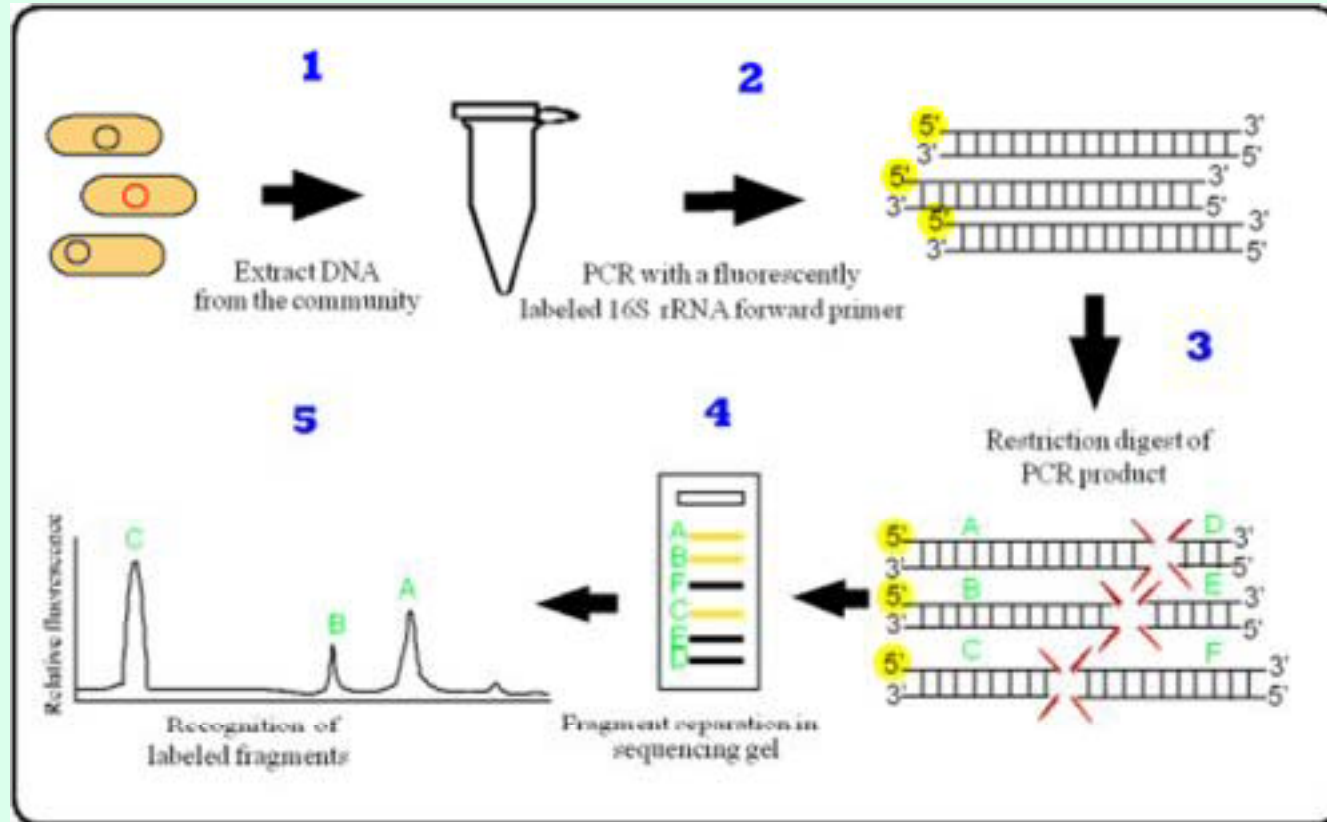


T-RFLP



Análisis de datos

# T-RFLP



Grüntzig et al. 2002

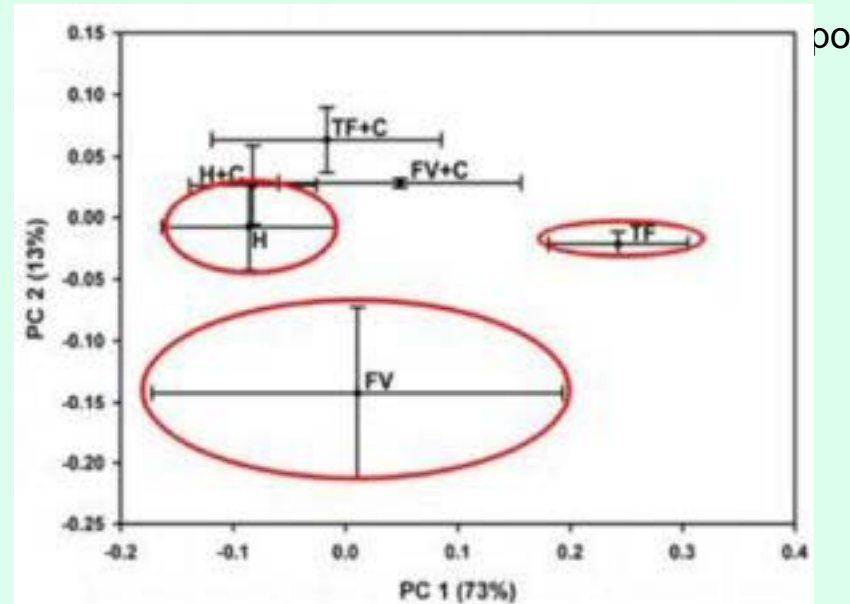
	Cultivo	Exp.	Muestra	Tipo de manejo de suelo					
				TF	TF+C	H	H+C	FV	FV+C
1.	Tomate	Inv	R						
2.			S						
3.		Campo	R						
4.			S						
5.	Edamame	Inv	R						
6.			S						
7.		Campo	R						
8.			S						

**TF, descanso; H, pastos; FV, vegetales; +C, compost**

## Hipótesis:

1. El tipo de manejo de suelo influye en la estructura de la comunidad microbiana
2. La población (fluorescencia) de grupos específicos de microorganismos (TRF) difiere en respuesta al tipo de manejo
3. Los TRF más abundantes en los suelos supresores están inversamente correlacionados con la presencia de enfermedad

# Efecto del tipo de cultivo en los perfiles de la comunidad bacteriana



Benítez et al., 2007

**Se observa variación en los perfiles de T-RFLP de 16S en respuesta al tipo de cultivo**



# Efecto del tipo de cultivo en las poblaciones de TRF (16S)

Crop	Exp.	Sample	TRF	Transition strategy												
				TF	TF+C	H	H+C	FV	FV+C							
Tomato	GH	S	137	0.6	cd	4.5	ab	7.5	a	2.9	bc	2.4	bcd	0	d	
			139	0.7	cd	0.8	bcd	5.8	a	2.8	bc	2.7	b	0	d	
			141	0.3	c	2.8	bc	9.4	a	6	b	2	c	3.3	bc	
	Field	S	180	2	b	0	c	5.7	b	7.9	a	2	b	1.2	b	
			R	141	4.5	a	3.3	b	3.2	b	4.9	ab	1.5	c	1.6	c
			182	0.9	b	0.8	bc	0.2	c	1.5	a	2	a	1.6	a	

Benítez et al., 2007

**TRF M137, M139 y M141** más abundantes en los suelos previamente expuestos al cultivo de pastos

# Proporción de correlaciones negativas % de enfermedad y fluorescencia de TRF (16S)

Crop	Sample <sup>c</sup>	TRF associated with transitions strategies exhibiting	
		Lowest % damping-off	Mid/high % damping-off
Tomato	R	0.67	0.58
	S	0.61	0.50
Soybean	R	0.69	0.50
	S	0.73	0.54
Tomato + soybean	R	0.68	0.56
	S	0.68	0.52
Tomato + soybean	R + S	0.68	0.54*

Benítez et al. 2007

**TRF (16S) más abundantes en los suelos previamente expuestos a pastos presentan **mayor frecuencia de correlaciones negativas** con la mortandad de plántulas**

# **Estudio de la comunidad microbiana (asociación con gradiente de supresión)**

- **Variación en los perfiles de T-RFLP de 16S en respuesta al tipo de cultivo y nivel de enfermedad del suelo**
- **Los TRF de 16S M137, M139, M141 y M148 fueron asociados con los suelos supresores en varios contextos**
- **Los TRF de 16S asociados con los suelos supresores presentan mayor frecuencia de correlaciones negativas con la mortandad de plántulas**

Benítez et al., 2007



# Hipótesis

- Especies de bacterias que dan lugar a un fragmento terminal del gen de 16S (tratado con *MspI*) de 137, 139, 141 ó 148 nt tienen la capacidad de disminuir enfermedades de suelo

# Identificación de microorganismos asociados con la supresión

1. Identificación de un gradiente de supresión
2. Asociación estadística de miembros de la comunidad microbiana (marcadores moleculares) con la supresión
- 3. Identificación y aislamiento de microorganismos en base a presencia de marcadores moleculares**
4. Caracterización de la capacidad de supresión por parte de las poblaciones aisladas

Modificado de Borneman et al 2007 *Manual Env Microbiol 3rd Ed.*

# Clasificación de TRF - Base de Datos (MiCA - RDP)

Expected <i>MspI</i> TRF size (bp) <sup>a</sup>	Bacterial genera
137 (2)	<i>Paenibacillus</i> , <i>Thiocapsa</i>
139 (12)	<i>Actinocorallia</i> , <i>Bacillus</i> (2) <sup>b</sup> , <i>Chitinimonas</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Micromonospora</i> (6), <i>Nonomuraea</i> , <i>Ottowia</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Parastreptomyces</i> , <i>Rhodococcus</i> (2), <i>Salinispora</i> (9), <i>Streptacidiphilus</i>
141 (11)	<i>Actinomadura</i> , <i>Burkholderia</i> (11), <i>Dehalobacter</i> , <i>Frankia</i> (3), <i>Leptothrix</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Pseudonocardia</i> (5), <i>Ruania</i> , <i>Schlegella</i> (2), <i>Streptomyces</i>
148 (8)	<i>Actinomyces</i> , <i>Aerococcus</i> (8), <i>Bacillus</i> (2), <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Halobacillus</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> (3)

Benítez et al., 2007

**Cada TRF representado por al menos 2 - 12 géneros**

# Metodología - Clonación TRF

Amplicones de 16S tratados con *MspI* (ADN de suelos y raíces)



Ligación de adaptador asimétrico en sitio de restricción



Selección de TRF de tamaño deseado ( ~ 130-160 bp)



Re-amplificación para enriquecimiento de muestras con TRF  
(16S F - *MspI* R)



Clonación y secuenciación

Benítez y McSpadden Gardener; modificado de Widmer et al. 2006

# Clasificación de los clones de TRF

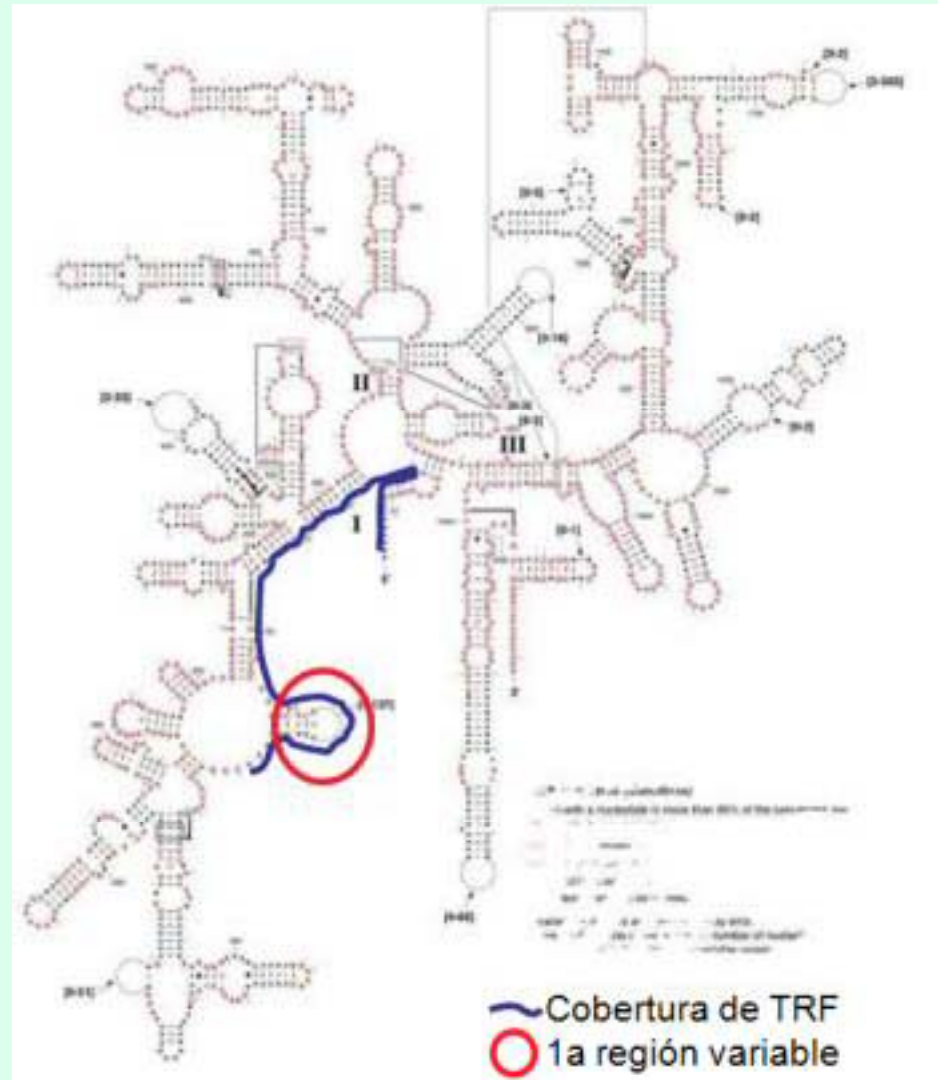
TRF size	Clone ID	Sequence similarity		
		Higher rank taxonomy	Order	Family
139	S101D, SB42G, S102A, SB81G	$\beta$ -Proteobacteria	Burkholderiales	Genera <i>Incertae</i> Comamonadaceae
	SB11G	$\beta$ -Proteobacteria		
	SB12G	$\alpha$ -Proteobacteria	Rhizobiales	
	SB41H	multiple divisions		
141	SB41E, SB41G, SB42F, SB71E	$\beta$ -Proteobacteria	Burkholderiales	Genera <i>Incertae</i> Burkholderiaceae Comamonadaceae
	SB31A	multiple divisions		
	S102G	multiple divisions		
	S101F	multiple divisions		
	SB31C	multiple divisions		

Benítez y McSpadden Gardener, en prensa

- Más de un grupo de bacterias representada dentro de cada TRF
- Clones independientes de 139 y 141 nt presentaron similitud con miembros del orden **Burkholderiales**

# Extensión de la información de secuencias de TRF

[www.rna.icmb.utexas.edu](http://www.rna.icmb.utexas.edu)  
Cannone et al, 2002



# Comparación de secuencias en la 1a región variable - Burkholderiales

	región variable	
<i>Leptothrix cholodnii</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGTA--GAGGA-G-----CAATECTCG---ACAGTGGCC
<i>Aquabacterium commune</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGGG-G-----CAA-ECTGGCCACGAGTGGCC
<i>Ideonella dechloratans</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGGG-G-----CAA-ECTGGCCACGAGTGGCC
<i>Mitsuaria chitosanitabida</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGGG-G-----CAA-ECTGGCCACGAGTGGCC
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGTAACAGGCC-G-----CAA-GGTGCTGACGAGTGGCC
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGTGGCAGTGGCC
<i>Thiomonas cuprina</i>	CACATGCAAGTCGA	TCGCAGCACTCCGGAGCTTGCAT-ETGGG--CGAGTGGCC
<i>Alcaligenes aquatilis</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGAGAGAGCTTCTCTTGGTGGCAGTGGCC
<i>Burkholderia cepacia</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGCTG----CTTGCACTCGTGGCAGTGGCC
<i>Burkholderia caryophylli</i>	CACATGCAAGTCGA	CGG-ATGAGGGAG--CTTGCTC-CTTGAT--TCAGCGCC
<i>Ralstonia eutropha</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGG-----CTTCGGTCTGGTGGCAGTGGCC
<i>Rhodiferax ferrireducens</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGTGGCAGTGGCC
<i>Acidovorax facilis</i>	CACATGCAAGTCGA	CGG-ATGAGGCC-----TTCCGGTGGTATTAGTGGCC
<i>Conamonas nitrativorans</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGA-----CTTCGGTCTGGTGGCAGTGGCC
<i>Polaromonas aquatica</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGG-----GCAACTGGCCACGAGTGGCC
<i>Variovorax paradoxus</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGCCGGCAGTGGCC
<i>Ramlibacter tataouinensis</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGCGG-----CAACECTGGTGGCAGTGGCC
<i>Herbaspirillum seropedicase</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGCATAAG-A---GCTTGCTECTGATGGCAGTGGCC
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGG-A---GCTTGCTECTGATGGCAGTGGCC
<i>Ghalobacter formigenes</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGCATEGG-G---GC---CAACTGATGGCAGTGGCC
<i>Torresbacterium litidus</i>	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----GCTTGCTCTGGTGGCAGTGGCC
SB41E	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGTGGCAGTGGCC
SB41G	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGTGGCAGTGGCC
SB42F	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGTGGCAGTGGCC
SB1E	CACATGCAAGTCGA	CGGCAGACGGGAG-----CAATECTGGTGGCAGTGGCC
S101D 139	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGG-----GCAACTGGCCACGAGTGGCC
S102A 139	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGG-----GCAACTGGCCACGAGTGGCC
SB42G 139NT	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGCGGG-----GCAACTGGCCACGAGTGGCC
SB81G 139NT	CACATGCAAGTCGA	CGGTAAGTGGG-----GCAACTGGCCACGAGTGGCC

141

139



# Clones de ~450 nt (TRF extendido)

**25% de los clones (n=16) sobrelapan con clones anteriores (76 and 78 nt) y tienen similitud a:**

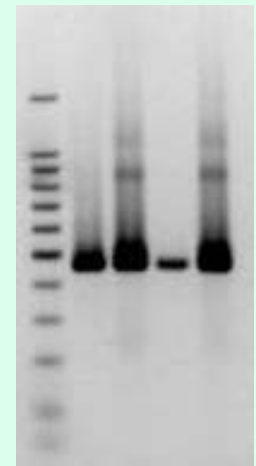
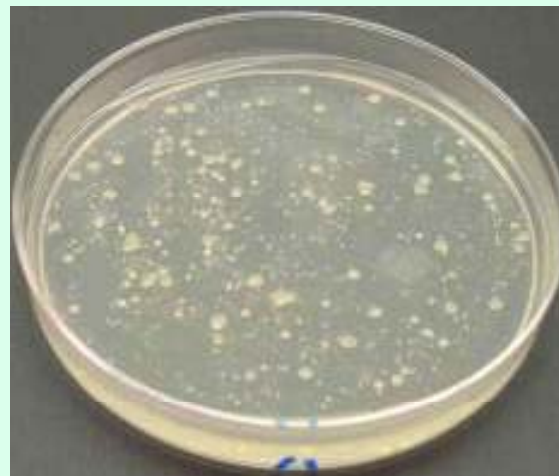
- a. **Burkholderiales - Genera *Incertae Sedis***  
*Leptothrix, Ideonella, Methylibium, Schlegella*
  
- b. **Burkholderiales - Comamonadaceae**  
*Ramlibacter, Curvibacter*

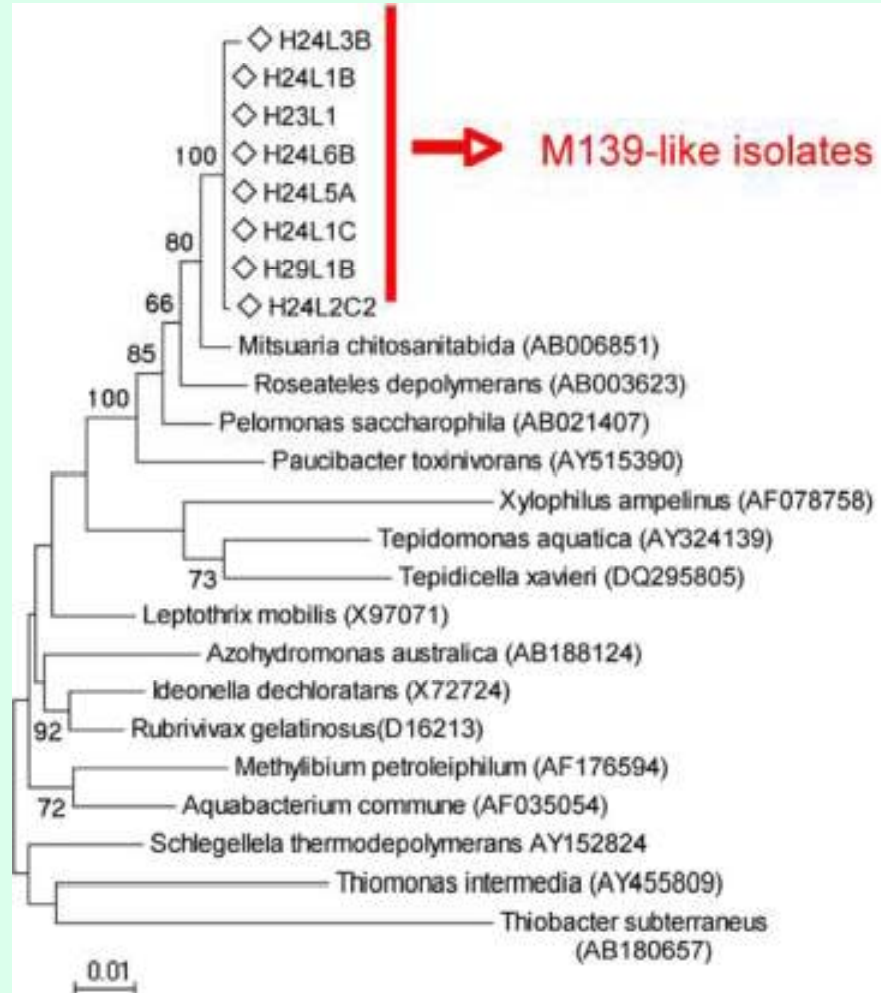
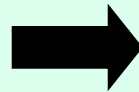
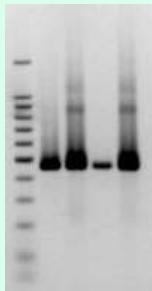
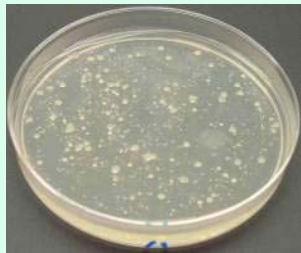


# Estrategia para el aislamiento en base a marcadores moleculares

**Muestras:** Suelos supresores (expuestos a pastos)

**Medios de cultivo:** que favorecen crecimiento de Comamonadaceae y Genera *Incertae Sedis*

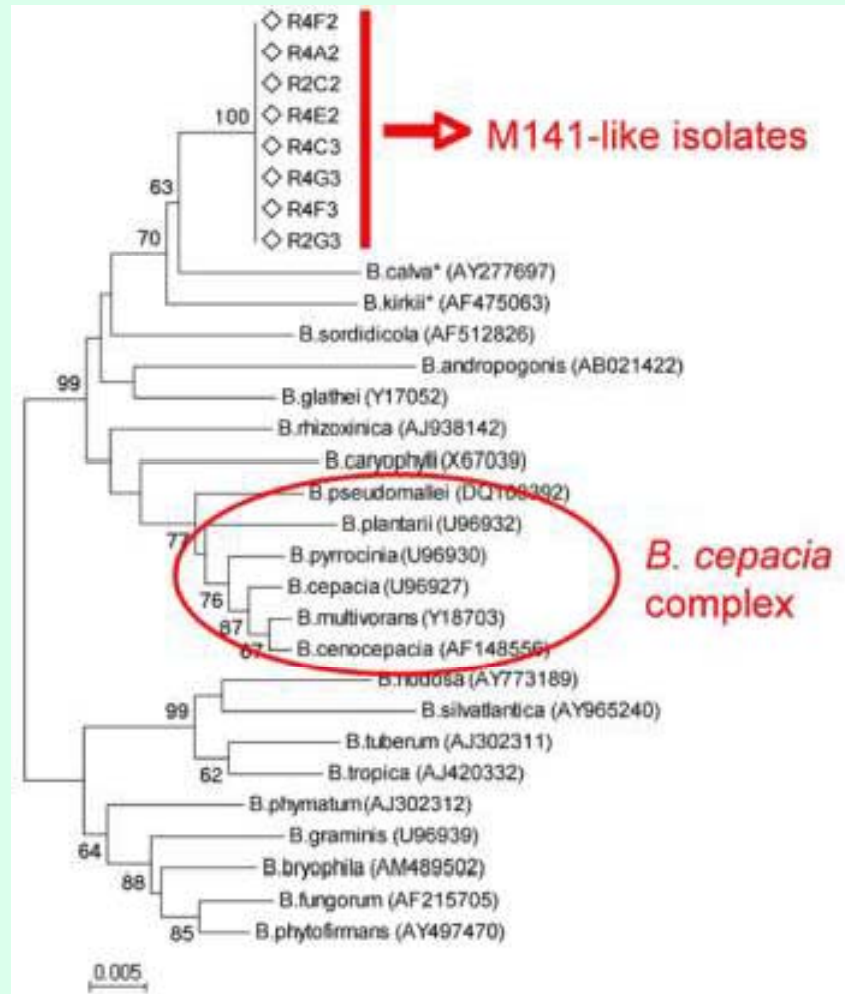
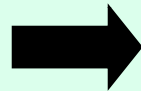
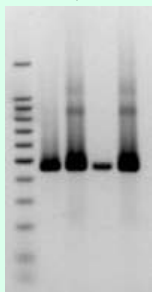
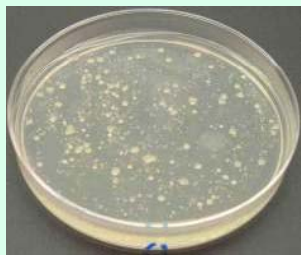




Genera *Incertae*  
(Burkholderiales)

Benítez y McSpadden Gardener, en prensa

**Cepas con similitud a TRF M139 - *Mitsuaria* sp.**



Benítez y McSpadden Gardener, en prensa

**Cepas con similitud a TRF M141 - *Burkholderia* sp.**

# Identificación de microorganismos asociados con la supresión

1. Identificación de un gradiente de supresión
2. Asociación estadística de miembros de la comunidad microbiana (marcadores moleculares) con la supresión
3. Identificación y aislamiento de microorganismos en base a presencia de marcadores moleculares
4. **Caracterización de la capacidad de supresión por parte de las poblaciones aisladas**

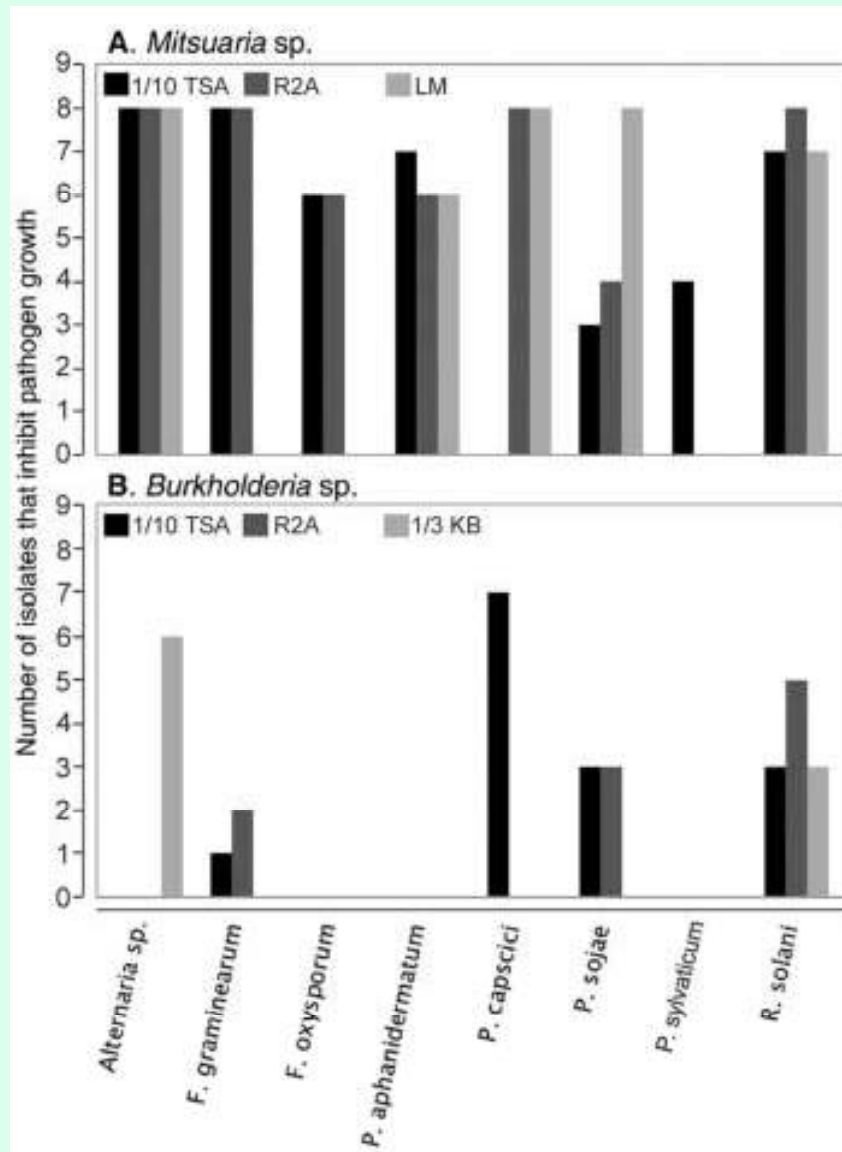
Modificado de Borneman et al 2007 *Manual Env Microbiol 3rd Ed.*

# Hipótesis

- Individuos de *Mitsuaria* sp. y *Burkholderia* sp. aislados en este experimento tienen capacidad supresora sobre enfermedades de suelo



# Pruebas de inhibición *in vitro*



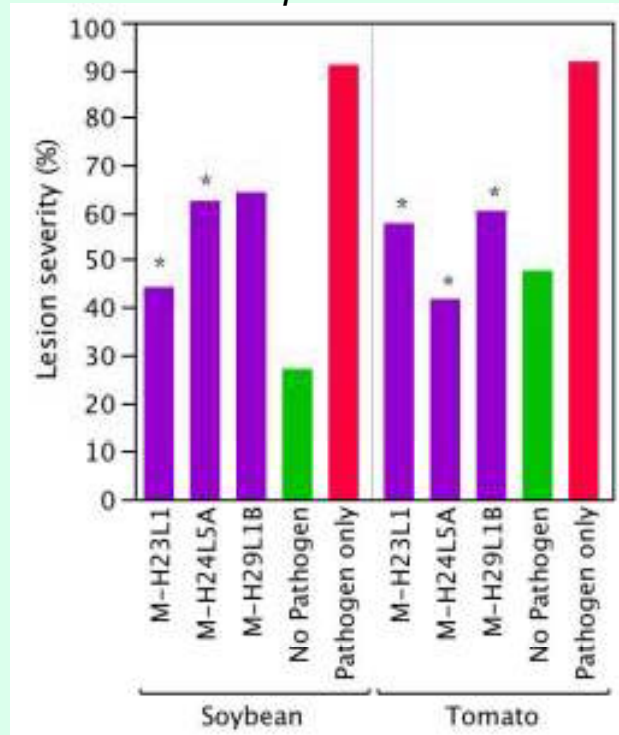
Inhiben múltiples especies de patógenos de soya y tomate

Benítez y McSpadden Gardener, en prensa

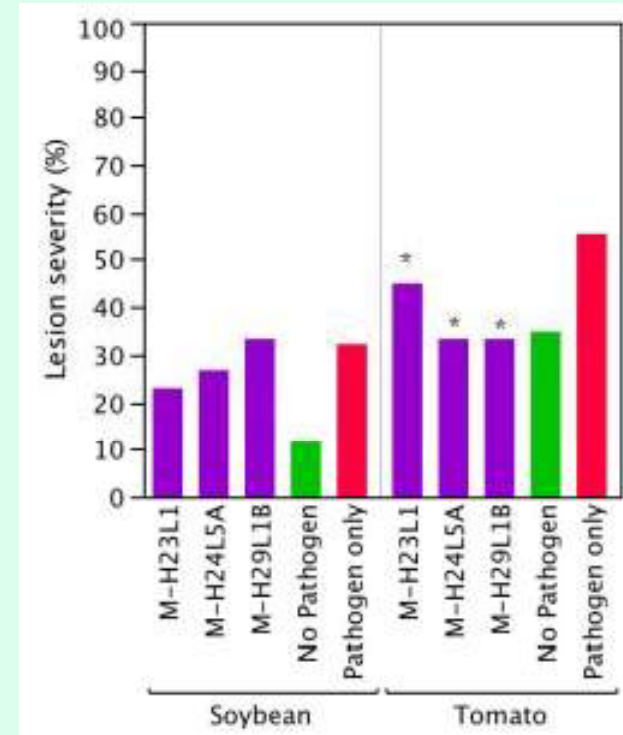
# Ensayo en plántulas

## *Mitsuaria* sp.

*P. aphanidermatum*



*R. solani*

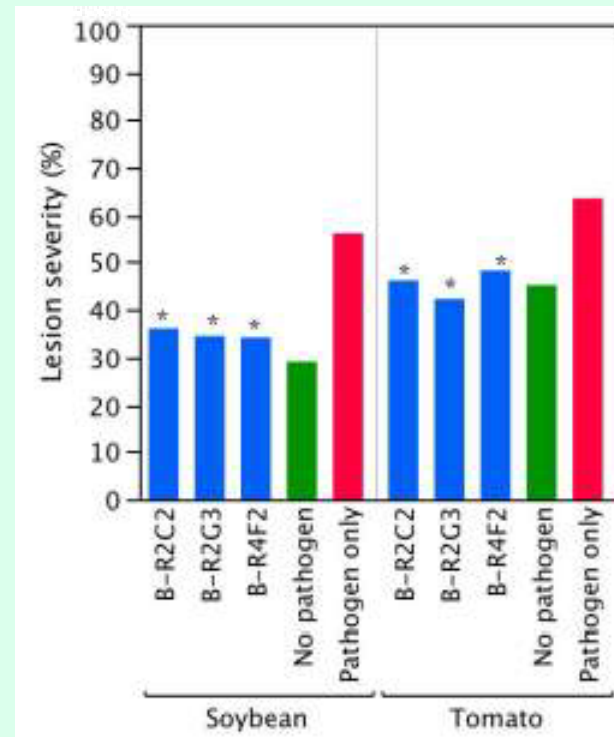


**Disminución en la lesión causada por *P. aphanidermatum* y *R. solani* (soya y tomate) al ser tratado con *Mitsuaria* sp.**

Benítez y McSpadden Gardener, en prensa

# Ensayo en plántulas *Burkholderia* sp.

*R. solani*



**Disminución en la lesión causada por *R. solani* (soya y tomate) al ser tratado con *Burkholderia* sp.**

Benítez y McSpadden Gardener, en prensa



# Conclusiones

- ***Burkholderia* sp. y *Mitsuaria* sp. aisladas en este trabajo, a partir de marcadores moleculares del gen de 16S, presentaron características de supresión de patógenos**

# Identificación de microorganismos asociados con la supresión

- 1. Identificación de un gradiente de supresión**
- 2. Asociación estadística de miembros de la comunidad microbiana (marcadores moleculares) con la supresión**
- 3. Identificación y aislamiento de microorganismos en base a presencia de marcadores moleculares**
- 4. Caracterización de la capacidad de supresión por parte de las poblaciones aisladas**

Modificado de Borneman et al 2007 *Manual Env Microbiol 3rd Ed.*