

APLICACION DE PERFILES MOLECULARES DE LA COMUNIDAD MICROBIANA PARA LA IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA SUPRESION DE ENFERMEDADES DEL SUELO

María Soledad Benítez y Brian McSpadden Gardener¹

RESUMEN

Las comunidades microbianas en suelos y raíces están influenciadas por factores físico-químicos del suelo, así como por las características de la comunidad vegetal. Estos factores son a su vez afectados por el tipo de manejo del suelo y los cultivos. En este trabajo se describe el estudio de la asociación entre miembros de la comunidad bacteriana, estudiada a través de diferencias en patrones de restricción del gen de 16S rADN, y suelos resultantes en distintos niveles de supresión de mortandad de plántulas. A partir de estas asociaciones iniciales, fue posible diseñar una metodología basada en diferencias en la primera región variable del gen de 16S, para identificar y aislar miembros de la comunidad microbiana que posean características que podrían contribuir a la supresión observada en el campo. Este trabajo representa un ejemplo de como una metodología semejante puede ser utilizada para identificar microorganismos asociados con múltiples funciones en el suelo, que sean cuantitativamente diferenciables, a partir de caracterizaciones moleculares de las comunidades microbianas.

INTRODUCCION

Uno de los retos que enfrenta la ecología microbiana como ciencia es el reconocer o identificar individuos o grupos de la comunidad microbiana que cumplan una función determinada en el ecosistema (Torsvik y Ovreas, 2002). Esto es de gran importancia, no solo desde un punto de vista ecológico, sino también porque contribuye al descubrimiento de microorganismos que puedan ser utilizados para aplicaciones biotecnológicas a nivel médico, industrial y/o agrícola (Daniel, 2005; Van Lanen y Shen, 2006). Borneman y colaboradores (2007) describen varios pasos a considerarse en el diseño de experimentos dirigidos a la identificación de microorganismos que cumplan una función específica. Estos pasos incluyen 1) la observación de un gradiente de una función mediada por microorganismos 2) la correlación de dicho gradiente con la presencia y abundancia de miembros de la comunidad microbiana y 3) la identificación, aislamiento y confirmación de actividad, de los microorganismos de interés. Este trabajo describe la aplicación de dicho diseño experimental para la identificación de microorganismos asociados a la supresión de enfermedades del suelo.

La estructura de las comunidades microbianas en suelos y raíces depende no solo de factores físico-químicos del suelos, sino también de la cobertura y diversidad vegetal, y el manejo del suelo (Garbeva et al., 2004a). En el área agrícola, los microorganismos del suelo y los asociados a raíces, cumplen múltiples funciones, incluyendo, entre otras, patógenos vegetales, y microorganismos supresores de patógenos y promotores de crecimiento vegetal (Cook, 2007). Los patógenos de suelos ocasionan grandes pérdidas y el manejo de las enfermedades de suelo es complejo y costoso (Cook, 2007). Los estudios de ecología microbiana con énfasis en suelos agrícolas contribuyen al desarrollo de prácticas sostenibles para el control de patógenos de suelo y otras dolencias vegetales (Mazzola, 2004). Así mismos los microorganismos presentes en el suelo, y los asociados a raíces, tallos, follaje y flores, representan una fuente de diversidad para el descubrimiento de nuevos agentes para el control biológico de plagas y enfermedades. Los suelos pueden ser intrínsecamente supresores de patógenos, o conducentes (que favorecen) a la expresión de una enfermedad. Un suelo supresor es aquel en el cual, pese a condiciones ambientales favorables, el patógeno no se establece en el suelo, se establece pero no produce enfermedad, o se establece y produce enfermedad por un tiempo pero luego ésta declina

¹ Departamento de Fitopatología. The Ohio State University, Wooster, OH, USA.
Correo electrónico: msbenitezponce@gmail.com

(Baker y Cook, 1974). En términos biológicos, la supresión puede ser resultado de la actividad específica de uno o pocos microorganismos antagonistas, o de la acción colectiva de los miembros de la comunidad microbiana (Baker y Cook, 1974).

Diferentes metodologías pueden ser utilizadas para el análisis de comunidades microbianas en suelo y otros ambientes, así como para el descubrimiento de microorganismos asociados a funciones específicas en el ecosistema (Borneman et al., 2007; Torsvik y Ovreas, 2002). Los métodos microbiológicos independientes de cultivos se basan principalmente en la comparación a nivel de secuencias de ADN o ARN. Dichos métodos proveen la ventaja de acceder a poblaciones de microorganismos que no han podido ser cultivados por métodos tradicionales (Hugenholz y Pace 1996; Tiedje et al 1999). El T-RFLP (polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal) es una metodología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que puede ser utilizada para crear perfiles o mapas genéticos (o “huellas digitales”) de la comunidad microbiana (Marsh 1999; Nichols 2007). Al ser el T-RFLP una metodología basada en secuencias de ADN, es posible, a partir de esta información inferir la filogenia de los miembros de la comunidad de interés y desarrollar una metodología de aislamiento dirigido para su cultivo. El cultivo de microorganismos es requerido con el fin de estudiar su función.

Dentro de un contexto de transición de agricultura convencional a agricultura orgánica, el objetivo general de este trabajo consistió en la identificación de grupos de microorganismos que contribuyan a la supresión de patógenos de suelo. Los objetivos específicos fueron i) determinar los efectos de distintos tipos de manejo de suelo en la incidencia de mortandad de plántulas de soya y tomate, y en la comunidad bacteriana de suelos y raíces ii) identificar correlaciones entre la miembros de la comunidad bacteriana (representada por perfiles de T-RFLP) y la supresión de la mortandad de plántulas y iii) obtener cultivos puros de los microorganismos asociados con la supresión y confirmar su actividad. Cada uno de estos objetivos fue estudiado con mayor detalle a los presentado en este trabajo, y dichos resultados están descritos en Baysal et al. (2008), Benítez et al. (2007) y Benítez y McSpadden Gardener (en prensa).

METODOLOGIA

1. Identificación de un gradiente de supresión de mortandad de plántulas: Se estudiaron los efectos de distintos tipos de manejo de suelo, utilizados durante la transición de agricultura convencional a agricultura orgánica, en el índice de mortandad de plántulas de soya y tomate. Los tipos de manejo estudiados fueron 1) un cultivo perenne de pastos, trébol y alfalfa 2) una zona en descanso arada y 3) un cultivo de vegetales mixtos. El ensayo fue establecido en Wooster, Ohio, en el Ohio Agricultural Research y Development Center, entre los años 2003 y 2006. Tres ensayos independientes de supresión fueron realizados en el invernadero, utilizando suelos traídos del campo, y un cuarto ensayo se realizó en el campo. El índice de mortandad de plántulas fue estimado en base al porcentaje de semillas no germinadas, y los datos fueron obtenidos aproximadamente a los 17 y 21 días después de sembradas las semillas de soya y tomate, respectivamente. La metodología esta descrita con mayor detalle en Baysal et al. (2008).

2. Perfil genético de la comunidad microbiana analizado a través de T-RFLP: Diferencias en la estructura de la comunidad microbiana, en respuesta a los distintos tipos manejos de suelo, fueron determinadas a través de la comparación de mapas genéticos de T-RFLP del gen de ADN ribosomal 16S para bacterias. Se obtuvieron muestras de ADN de los suelos utilizados en los ensayos de campo e invernadero y de la rizosfera de soya y tomate. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción de ADN de suelos UltraClean (MoBio). El gen de 16S se amplificó utilizando los primers universales para bacterias, 8F y 1492R (Weisburg et al., 1991), y el primer 8F fue marcado con el fluoroforo WellRED (Sigma Proligo) para la visualización de los fragmentos de restricción terminal (fragmento terminal). El protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito en Benítez et al. (2007). Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *MspI* y

posteriormente sometidos a una electroforesis capilar para así detectar únicamente los fragmentos terminales que contienen la fluorescencia. Los resultados fueron analizados por separado de acuerdo a ensayo (campo o invernadero), cultivo (soya o tomate) o muestra (suelo o rizosfera). El análisis de datos está descrito en detalle en Benítez et al. (2007). Este incluyó análisis multivariado de componentes principales, análisis de variancia no paramétrico (Kruskall-Wallis) y cálculo del índice de correlación de Spearman entre la abundancia relativa de los fragmentos de restricción terminales y el índice de mortandad de plántulas.

3. Clonación e identificación de fragmentos de restricción terminal: Se clonaron fragmentos de restricción terminal, correspondientes en tamaño (pares de bases) a aquellos que presentaron correlación con la supresión de mortandad de plántulas de soya y tomate, en múltiples ensayos. Para esto se utilizó un adaptador que reconoce el sitio de restricción de *MspI*. Una segunda reacción de PCR con el primer 8F y un segundo primer que reconoce el adaptador permitió el enriquecimiento de fragmentos terminales en las muestras. Dichos productos fueron clonados y secuenciados por métodos convencionales. Esta metodología fue modificada en base a Widmer et al. (2006) y esta descrita en detalle en Benítez y McSpadden Gardener (en prensa). Con el fin de obtener mayor información de valor filogenético se diseñaron primers que permitan extender la información (en pares de bases) del gen de 16S de los fragmentos de restricción de interés. Los primers fueron diseñados en base a la primera región variable del 16S ribosomal (Cannone et al., 2002), y están descritos en Benítez y McSpadden Gardener (en prensa).

4. Obtención de cultivos puros con secuencias similares a los fragmentos de restricción de interés: Los primers diseñados en el paso 3 fueron utilizados con el fin de obtener cultivos puros de bacterias que correspondan, en secuencia, con los fragmentos de restricción de interés. Se generó una colección de aislados bacterianos a partir de muestras del suelo correspondiente al manejo con la mayor supresión de mortandad de plántulas. Para esto, la mezcla de pastos correspondiente fue sembrada en los mismos suelos del ensayo de campo y mantenida en el invernadero. Para el muestreo, se mezclaron bien suelos y raíces y se utilizó dicho substrato para realizar diluciones múltiples de las muestras. La colección de bacterias fue generada utilizando cuatro diferentes medios de cultivo que favorecen el crecimiento de los grupos bacterianos identificados en el paso 3 y los medios están descritos en más detalle en Benítez y McSpadden Gardener (en prensa), en base a Atlas. (1997). Los aislados fueron posteriormente analizados por PCR para determinar la presencia de la región variable, específica para los fragmentos 139 y 141. Las cepas que dieron una amplificación positiva fueron clasificadas, en base a la secuencia del gen 16S (amplificación con los primers 8F y 1942R).

5. Ensayos de inhibición de crecimiento de patógenos y supresión de lesiones en plántulas: Con el fin de comprobar la capacidad de las cepas aisladas e identificadas en el paso 4, de inhibir patógenos de soya y tomate se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento en plato. Cada cepa fue probada contra ocho patógenos de soya y tomate, y la inhibición fue determinada en tres diferentes medios de cultivo. La capacidad de supresión de lesiones en plántulas de soya y tomate fue determinada por medio de inoculación directa de una suspensión bacteriana en plántulas expuestas a diferentes patógenos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Este trabajo describe el uso de múltiples metodologías para la identificación de nuevos grupos de microorganismos asociados a la supresión de enfermedades del suelo. Partiendo de observaciones de diferencias en el campo e invernadero, y a través de la aplicación de T-RFLP para el estudio de la comunidad microbiana, fue posible observar correlaciones entre miembros de la comunidad microbiana (marcados por un fragmento de restricción terminal) y la supresión de mortandad de plántulas de soya y tomate. Así mismo, la información de T-RFLP fue utilizada para diseñar una

estrategia de aislamiento y selección de grupos bacterianos relacionados a aquellos que previamente demostraron una correlación positiva con la supresión.

Múltiples ensayos, descritos en detalle en Baysal et al. (2008), demostraron que, suelos expuestos a un cultivo perenne de pastos, trébol y alfalfa, presentaron una reducción en la mortandad de plántulas de soja y tomate comparado con suelos expuestos a cultivos de vegetales y una zona en descanso. Estas diferencias en índice de mortandad de plántulas fueron observadas tanto en el invernadero como en el campo, siendo significativas en 3 de los 4 ensayos en soja y en 2 de los 4 ensayos en tomate. La Figura 1 muestra los resultados de los ensayos de campo realizados en el 2006, para ambos cultivos.

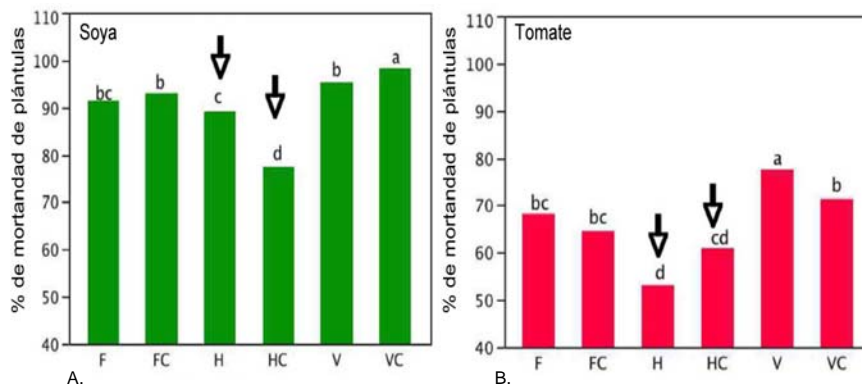


Figura 1. Diferencias en el porcentaje de mortandad de plántulas de (A) soja y (B) tomate en respuesta a distintos manejos de suelos. F, suelos en descanso; H, pastos; V, vegetales; C, compost.

La capacidad de supresión de mortandad de plántulas en soja y tomate sugiere que la supresión conferida por el cultivo de pastos es general, es decir que es mediada por un efecto aditivo de la comunidad microbiana, y no necesariamente por un microorganismo antagonista a un patógeno específico. Otros autores han demostrado que ciertos cultivos mixtos, así como zonas de pastizales, son supresores a patógenos de suelos, y que la diversidad y actividad microbiana en estos cultivos es mayor, no solo a nivel de la comunidad en general, sino también en relación a grupos específicos de antagonistas de patógenos de plantas (Garbeva et al., 2004b; Garbeva et al., 2006; Salles et al., 2006; Seigies y Pritts, 2006; Zak et al., 2003).

Los perfiles de la comunidad bacteriana, obtenidos por medio de un mapeo en sitios de restricción de amplicones de 16S rADN, fueron analizados utilizando múltiples análisis estadísticos. Las diferentes pruebas estadísticas fueron utilizadas con el fin de identificar asociaciones entre miembros de la comunidad bacteriana (representados por un fragmento de restricción terminal) y diferencias en la supresión de enfermedades de suelo observadas. El análisis de componentes principales, obtenidos con datos de T-RFLP, permitió reconocer los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana como consecuencia de distintos manejos de suelo.

Las gráficas de ordenación indican una separación en la comunidad bacteriana, como respuesta al manejo del suelo. Como ejemplo, la Figura 2 muestra la separación de los perfiles de T-RFLP de muestras obtenidas de los diferentes manejos de suelo. Esto fue observado tanto en muestras de suelo y rizosfera, en campo e invernadero y en soja y tomate. El análisis de componentes principales permitió también identificar los miembros de la comunidad (fragmentos terminales) que más contribuyen a la separación de cada tipo de manejo, siendo M148, uno de los fragmentos terminales

que contribuyó más a la separación, a lo largo de los dos primeros componentes principales, de tratamientos en todos los contextos analizados.

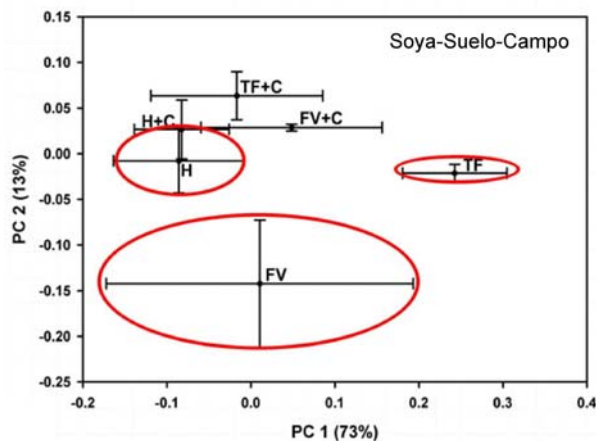


Figura 2. Gráfica de ordenación del análisis de componentes principales de los datos de T-RFLP. Los óvalos rojos indican la separación entre comunidades. TF, suelos en descanso; H, pastos; FV, cultivo de vegetales; C, compost.

<i>E.coli</i>	DGG - TAACAGGAAGAAGCTTGTTCTTTGGTGCAGAB	STG
<i>Leptothrix_ginsengisoli</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Leptothrix_mobilis</i>	DGGTAGAGGGGCA --- ACCCTGA --- GA ---	STG
<i>Aquabacterium_communis</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAAGCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Aquabacterium_parvum</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAAGCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Ideonella_dechloratans</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Ideonella_sp.</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Mitsuaria_chitosanitabida</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAAGCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Rubrivivax_gelatinosus</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAAGCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Aquicola_ferriarabensis</i>	DGGTAAAGCGGGG --- CAAGCTGGCBAAGA ---	STG
<i>Methylobium_petroleiphilum</i>	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
<i>Burkholderia_canoespacia</i>	DGGCAGACGGGT - GCTTGCACCTGGTGGGA ---	STG
<i>Burkholderia_caryophylli</i>	DGGATGACGGGA --- GCTTGCACCTGGTGGGA ---	STG
<i>Cupriavidus_basilensis</i>	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
<i>Ralstonia_szygii</i>	DGGCAGACGGGTAGCTTGCCTGCCGGGA ---	STG
<i>Rhodiferax_ferrireducens</i>	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
<i>Acidovorax_facilis</i>	DGGATGAAGCC --- TTCGGTGGTATTGA ---	STG
<i>Acidovorax_avenae</i>	DGGTAAAGCGGGG --- TTCGGGA - TCTGGAAGA ---	STG
<i>Comamonas_nitrivorans</i>	DGGCAGACGGAC --- TTCGGTGGTGGGA ---	STG
<i>Variovorax_paradoxus</i>	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
SB41E	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
SB41G	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
SB42F	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
SB71E	DGGCAGACGGGA --- GCAATCTGGTGGGA ---	STG
S101D	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG
S102A	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG
SB42G	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG
SB81G	DGGTAAAGCGGGG --- CAACCTGGCBAAGA ---	STG

Figura 3. Comparación de secuencias de la primera región variable del rRNA 16S entre los clones de este trabajo (rojo) y miembros del orden Burkholderiales, y *E. coli* como referencia.

A través de análisis de variancia fue posible identificar varios fragmentos terminales significativamente más abundantes en los suelos cultivados con pastos, en comparación con los otros manejos estudiados. Cuatro fragmentos terminales (M137, M139, M141 y M148) fueron más abundantes en los suelos cultivados con pastos, en dos o más de los ensayos analizados. Finalmente, la asociación entre los fragmentos terminales más abundantes en suelos supresores y la supresión de enfermedades de suelos fue corroborada por medio del cálculo de coeficientes de correlación entre la abundancia del fragmento terminal y el índice de mortandad observado para cada contexto. En términos de proporción, aquellos fragmentos asociados a los cultivos de pastos (suelos supresores) presentaron significativamente un mayor número de correlaciones negativas con el índice de mortandad de plántulas, que los fragmentos terminales asociados con los otros manejos estudiados. Estos resultados están descritos con mayor detalle en Benítez et al. (2007) y sugieren el rol de múltiples grupos bacterianos, incluyendo fragmentos terminales del gen de 16S de 139 y 141 pares de bases, en la supresión observada en estos experimentos.

Una vez determinadas la asociación de varios miembros de la comunidad bacteriana, en este caso con la supresión de enfermedades de suelos, fue posible dirigir este estudio hacia la clasificación y aislamiento de los microorganismos de interés. Varios clones independientes, correspondientes a fragmentos terminales de 139 y 141 pares de bases, mostraron similitud, a nivel de secuencia de rADN 16S, con miembros del orden Burkholderiales. El análisis comparativo de dichas secuencias, con otros miembros del orden y con secuencias de referencia y la estructura del rARN (Cannone et al., 2002), permitió identificar zonas de especificidad en la primera región variable del rARN 16S (Figura 3). Esta información fue utilizada para obtener información filogenéticamente relevante para este grupo de bacterias. Se recuperaron varias secuencias de aproximadamente 500 pares de bases que presentaban la misma secuencia en la primera región variable, que la de los fragmentos terminales de 139 y 141 pares de bases, respectivamente. Dentro de este grupo de clones, se observó una similitud de > 97% con secuencias del orden Burkholderiales, pertenecientes a *Genera Incertae Sedis* y Comamonadaceae, respectivamente.

A partir de una colección de más de 700 aislados bacterianos obtenidos de suelos y raíces de pastos, correspondientes a los suelos supresores, fue posible identificar aislados bacterianos con secuencias correspondientes a los marcadores de los fragmentos terminales M139 y M141, respectivamente. De los 700 aislados, ocho fueron positivos para el marcador molecular del fragmento M139 y otros ocho para el fragmento M141. Estas bacterias fueron aisladas utilizando los medios de cultivo para *Leptothrix* y R2A, respectivamente (Atlas, 1997). Ambos grupos bacterianos fueron asignados al orden Burkholderiales, y fueron clasificados en los géneros *Mitsuaria* (M139) y *Burkholderia* (M141), en base a un porcentaje de similitud de > 98% en la secuencia del gen 16S (en un rango de aproximadamente 1300 pares de bases) con otras especies del género. El género *Mitsuaria* posee una única especie, *M. chitosanitabida* (Amakata et al., 2005), con varias cepas, aisladas de suelos de Japón que poseen la capacidad de degradar quitina (Yun et al., 2005). Dos estudios han observado la asociación de cepas de *Mitsuaria* con plantas, el primero en un contexto acuático y las cepas poseen la capacidad de degradar compuestos fenólicos (Muller et al., 2007), y en el segundo varios individuos fueron aislados de la rizosfera de una crucifera (Kaiser et al., 2001). El género *Burkholderia* es muy diverso y dentro de este se encuentran especies que son comunes no solo en plantas y suelos, sino también son simbioses de insectos y patógenos humanos (Coenye y Vandamme, 2003).

Especies de *Burkholderia* presentan la capacidad de inhibir patógenos de plantas y promover crecimiento vegetal; así mismo, tienen la capacidad de degradar múltiples compuestos, con posibilidad para aplicaciones en bioremediación. Dentro de este grupo, el complejo de especies de *B. cepacia* es el más importante en términos de patogénesis a humanos, sobretodo en pacientes con fibrosis cística (Coenye y Vandamme, 2003). Sin embargo, la filogenia de las cepas aisladas en este trabajo, respecto a la de especies previamente descritas, indica una clara separación con otras especies del género.

Dos tipos de ensayos fueron utilizados para determinar el potencial de las cepas de *Mitsuaria* y *Burkholderia* para la supresión de patógenos de suelo. En el primero se observó que los ocho aislados de *Mitsuaria* inhibían el crecimiento de varios patógenos de soja y tomate, incluyendo hongos y oomicetos, siendo *Pythium sylvaticum* el menos susceptible de los ocho patógenos examinados. Los aislados de *Burkholderia* mostraron también inhibición en el crecimiento de algunos de los patógenos, sin embargo con resultados más variables en relación al medio de cultivo utilizado en el ensayo. El patógeno más susceptible a los aislados de *Burkholderia* fue *Rhizoctonia solani*. Plántulas tratadas con los aislados de *Mitsuaria* o *Burkholderia*, y expuestas a diferentes patógenos, presentaron una menor lesión, que plántulas tratadas únicamente con agua (y expuestas a diferentes patógenos). La Figura 4 muestra un ejemplo de lo observado en los distintos tratamientos, lo cual se presenta en detalle en Benítez y McSpadden Gardener (en prensa). Estos últimos resultados sugieren que en efecto bacterias filogenéticamente relacionadas a los fragmentos de restricción terminales de interés (los asociados con los suelos supresores) poseen potencial para el control de patógenos de suelos.

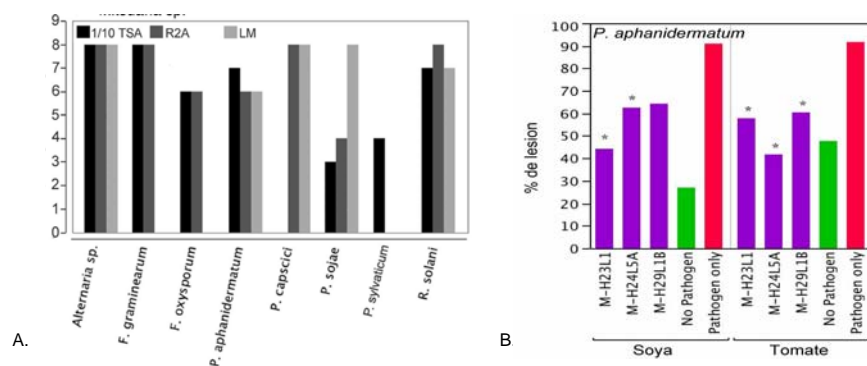


Figura 4. Ensayos de inhibición de crecimiento de patógenos (A) y ensayos en plántulas (B) de soya y tomate. Los datos corresponden a ensayos realizados con aislados de *Mitsuaria* sp.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo describe un ejemplo de como la combinación de múltiples metodologías y análisis estadísticos, aplicadas paso a paso, permiten identificar no solo asociaciones de microorganismos con una función, sino también el aislamiento e identificación de nuevas especies. Los grupos de microorganismos descritos en este trabajo son novedosos en varios aspectos. Primero porque al estudiar su filogenia se observa distinción entre las cepas de este trabajo y especies previamente descritas. Para el género *Mitsuaria*, este es el primer estudio que presenta la asociación del género con suelos supresores y con inhibición de patógenos. Los aislados de *Burkholderia* representan un grupo separado del complejo *B. cepacia*, y por lo tanto consisten en un grupo interesante para aplicaciones biotecnológicas, que no ha podido ser completado en *B. cepacia* por sus relaciones con los humanos (Parke y Gurian-Sherman 2001). Sin embargo, para la aplicación de estos microorganismos en el control biológico de patógenos de plantas, se requiere no solo la descripción detallada de estas nuevas especies, sino también estudios de mecanismos de acción, espectro y patogenicidad en otros organismos. Una metodología de trabajo semejante, basada en T-RFLP u otra herramienta para estudios de comunidades microbianas, puede ser utilizada para identificar microorganismos asociados a múltiples funciones, a partir de caracterizaciones moleculares. El T-RFLP ha sido utilizado previamente para caracterizaciones moleculares de la comunidad microbiana (Hurst et al., 2007; McSpadden Gardener y Weller, 2001; Rotenberg et al., 2007), y como herramienta de monitoreo en el aislamiento de microorganismos en cultivos de enriquecimiento (Cadillo-Quiroz et al., 2008; Jeon et al., 2003). Este trabajo sin embargo, incluye no solo el análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción, sino también su secuencia.

BIBLIOGRAFIA

- Amakata, D., Y. Matsuo, K. Shimono, J.K. Park, C.S. Yun, H. Matsuda, A. Yokota, and M. Kawamukai. 2005. *Mitsuaria chitosanitabida* gen. nov., sp nov., an aerobic, chitosanase-producing member of the 'betaproteobacteria'. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1927-1932.
- Atlas, R. 1997. Handbook of microbiological media. Lawrence C. Parks, editor. Second Edition ed. United States of America: CRC Press Inc. 1706 p.
- Baker, KF., and R.J. Cook. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco: W.H. Freeman and Company. 433 p.

- Baysal, F., M.S. Benítez, M.D. Kleinhenz, S.A. Miller, and B.B. McSpadden Gardener. 2008. Field management effects on damping-off and early season vigor of crops in a transitional organic cropping system. *Phytopathology* 98(5):562-570.
- Benítez, M.S. and B.B. McSpadden Gardener. Linking sequence to function in soil: Sequence-directed isolation of novel bacteria contributing to soilborne plant disease suppression. *Applied and Environmental Microbiology*, *en prensa*.
- Benítez, MS., F. Baysal, D. Rotenberg, M.D. Kleinhenz, J. Cardina, D. Stinner, S.A. Miller, and B.B. McSpadden Gardener. 2007. Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. *Soil Biology y Biochemistry* 39(9):2289-2301.
- Borneman J., O.J. Becker, E. Bent, B. Lanoil, B.B. McSpadden Gardener, R. Olatinwo, L. Presley, A.J. Scupham, L. Valinsky, and B. Yin. 2007. Identifying microorganisms involved in specific in situ functions: Experimental design considerations for rRNA gene-based populations studies and sequence-selective PCR assays. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garly JL, et al. eds. *Manual of environmental microbiology*. Third ed. USA: ASM Press. 748 p.
- Cadillo-Quiroz, H., E. Yashiro, J.B. Yavitt, and S.H. Zinder. 2008. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* 74(7):2059-2068.
- Cannone, J.J., S. Subramanian, M.N. Schnare, J.R. Collett, L.M. D'Souza, Y. Du, B. Feng, N. Lin, L.V. Madabusi, and K.M. Muller. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: An online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3:2.
- Coenye, T. and P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5(9):719-729.
- Cook, R.J. 2007. Management of resident plant growth-promoting rhizobacteria with the cropping system: A review of experience in the US pacific northwest. *Eur J Plant Pathol* 119(3):255-264.
- Daniel, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3(6):470-478.
- Garbeva, P., J.A. van Veen, and van J.D. Elsas. 2004a. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42:243-270.
- 2004b. Assessment of the diversity, y antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol Ecol* 47(1):51-64.
- Garbeva, P., J. Postma, J.A. van Veen, J.D. van Elsas. 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environ Microbiol* 8(2):233-246.
- Hugenholtz. P. and N.R. Pace. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol* 14(6):190-197.

- Hurst, C.J., R.L. Crawford, J.L. Garly, D.A. Lipson, A.L. Mills, L.D. Stetzenbach. 2007. Manual of environmental microbiology. Third ed. USA: ASM Press. 1293 p.
- Jeon, C.O., W. Park, P. Padmanabhan, C. DeRito, J.R. Snape, E.L. Madsen. 2003. Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(23):13591-13596.
- Kaiser, O., A. Puhler, W. Selbitschka. 2001. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*brassica napus* cv. westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microb Ecol* 42(2):136-149.
- Marsh, T.L. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2(3):323-327.
- Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annu Rev Phytopathol* 42:35-59.
- McSpadden Gardener, B.B., D.M. Weller. 2001. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Appl Environ Microbiol* 67(10):4414-4425.
- Muller, N., M. Hempel, B. Philipp, and E.M. Gross. 2007. Degradation of gallic acid and hydrolysable polyphenols is constitutively activated in the freshwater plant-associated bacterium *matsuebacter* sp FB25. *Aquat Microb Ecol* 47(1):83-90.
- Nichols, D. 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol* 60(3):351-357.
- Parke, J.L., D. Gurian-Sherman. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* 39:225-258.
- Rotenberg, D., A.J. Wells, E.J. Chapman, A.E. Whitfield, R.M. Goodman, and L.R. Cooperby. 2007. Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. *Soil Biology and Biochemistry* 39(11):2936-2948.
- Salles, J.F, J.D. van Elsas, and J.A. van Veen. 2006. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. *Microb Ecol* 52(2):267-279.
- Seigies, A.T. and M. Pritts. 2006. Cover crop rotations alter soil microbiology and reduce replant disorders in strawberry. *HortScience* 41(5):1303-1308.
- Tiedje, J.M., S. Asuming-Brempong, K. Nusslein, T.L. Marsh, S.J. Flynn. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13(2):109-122.
- Torsvik, V. and Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5(3):240-245.
- Van Lanen, S.G. and B. Shen. 2006. Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Curr Opin Microbiol* 9(3):252-260.



- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173(2):697-703.
- Widmer, F., M. Hartmann, B. Frey, and R. Kolliker. 2006. A novel strategy to extract specific phylogenetic sequence information from community T-RFLP. *J Microbiol Methods* 66(3):512-520.
- Yun, C.S., D. Amakata, Y. Matsuo, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 2005. New chitosan-degrading strains that produce chitosanases similar to ChoA of *Mitsuaria chitosanitabida*. *Appl Environ Microbiol* 71(9):5138-5144.
- Zak, D.R., W.E. Holmes, D.C. White, A.D. Peacock, and D. Tilman. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology* 84(8):2042-2050.