

UCH-FC
Biologo
F224
C.L

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**EFFECTOS DE LA RIZÓSFERA DE *Colletia hystrix* SOBRE LA COMUNIDAD
BACTERIANA DEL SUELO**

MEMORIA DE TÍTULO

ENTREGADA A LA

UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

BIÓLOGO CON MENCIÓN EN MEDIO AMBIENTE

POR

FELIPE ANDRÉS FARIÁS BERRÍOS

MAYO, 2006

SANTIAGO - CHILE

DIRECTOR DE MEMORIA DE TÍTULO: DRA MARGARITA CARÚ MARAMBIO



**“EFECTOS DE LA RIZOFERA DE *Colletia hystrix* SOBRE LA
COMUNIDAD BACTERIANA DEL SUELO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

FELIPE ANDRÉS FARÍAS BERRÍOS

Dra. Margarita Carú Marambio
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Margarita Carú Marambio, sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora

Dr. Elie Poulin
Presidente

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Elie Poulin, sobre una línea horizontal.

Dr. Marco Méndez Torres
Corrector

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Marco Méndez Torres, sobre una línea horizontal.

A VICENTA, IRMA & ERNESTO
MIS ABUELOS



FELIPE ANDRÉS FARIÁS BERRÍOS

ESTE GRAN PERSONAJE SIEMPRE SE HA CARACTERIZADO POR SER MUY “CABEZA DURA” Y DESDE SUS INICIOS, POR MÁS QUE SUS PADRES QUERÍAN QUE NACIERA, ÉL SE DIO TODO EL TIEMPO DEL MUNDO PARA AL FIN DARLES ESE PLACER, CREANDO MUCHOS DOLORES DE CABEZA A SUS PADRES Y POSTERIORMENTE A UNA GRAN CANTIDAD DE PERSONAS MÁS.

EN TODOS SUS COLEGIOS SE DESTACÓ POR SU GRAN INTELIGENCIA Y BUENAS NOTAS, PERO POR SOBRE TODO POR SER EL ALMA DEL DESORDEN, SACANDO DE SUS CASILLAS A VARIOS PROFESORES. LOS CUALES, AÚN ASÍ, LO RECUERDAN CON MUCHO CARIÑO Y RESPETO DEBIDO A OTRAS DE SUS CARACTERÍSTICAS LLAMATIVAS: SU GRAN TERNURA, GENEROSIDAD Y SOLIDARIDAD CON LOS DEMÁS. ESTO LE HA PERMITIDO HACERSE DE GRANDES AMIGOS; DESDE SUS INSEPARABLES DEL ALONSO DE ERCILLA, JUNTO A LA FUNDACIÓN GESTA HASTA AQUELLOS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. SIN DEJAR DE LADO, POR SUPUESTO, SU GRAN CONSOLIDACIÓN Y ACTIVA PARTICIPACIÓN CON AMIGOS DE DIVERSOS KLANES DEL QUAKE, GANANDO VARIOS TORNEOS EN DIVERSAS LIGAS Y TARREOS, COMO TAMBIÉN EN SU DEPORTE FAVORITO, EL FÚTBOL. DENTRO DE SU FAMILIA, JUNTO CON SER EL REGALÓN DE SUS PAPÁS, DESDE MUY PEQUEÑO PASÓ A SER EL REGALÓN DE SU ABUELA, ABUELO Y TAMBIÉN DE SUS PADRINOS, QUIENES LO CUIDARON Y APOYARON SIEMPRE.

FELIPE LLEGÓ A LA UNIVERSIDAD DE CHILE GRACIAS A SU PERSEVERANCIA Y DESEO DE SEGUIR UNA CARRERA, LA CUAL (GRACIAS A DIOS) NO ES LA QUE AHORA POSTULA A TERMINAR. TAMPOCO FUE LA CARRERA QUE DESDE PEQUEÑO DIJO QUE ESTUDIARÍA, PERO ES LA CARRERA QUE LO LLEVO A VER EL MUNDO DESDE OTRO PUNTO DE VISTA, MÁS HOLISTA E INTEGRADO. LA CARRERA QUE LE HA MOSTRADO SU VOCACIÓN Y LO HA COMPLETADO COMO HOMBRE, EN TODO SENTIDO...

HOY EN DÍA, FELIPE ESTÁ A UN PASO DE SALIR DE ESTA GRAN UNIVERSIDAD, SU UNIVERSIDAD, LA CUAL AGRADEZCO TAMBIÉN SEA LA MÍA, YA QUE ADEMÁS DE HABERNOS FORMADO... FUE LA QUE NOS UNIÓ.

CON MUCHO AMOR....

FIGURELLA

AGRADECIMIENTOS

PRIMERO QUE NADA QUIERO AGRADECER A MIS PADRES, PATRICIO & MAGALY POR TODO SU AMOR, ENTREGA, FORMACIÓN Y MUCHA, MUCHA PACIENCIA Y COMPRENSIÓN...GRACIAS A ELLOS ESTOY DONDE ESTOY, MUCHAS GRACIAS VIEJITOS...

A LA DRA MARGARITA CARÚ POR ACEPTARME, GUIARME Y AYUDARME EN TODO MOMENTO A LO LARGO DE ESTA TESIS, A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO REINA JUANITA, FEÑA, CATA, LORE, MARCE, RAFA, MARCO, POR SUS CONSEJOS, APOYO Y AGUANTAR MIS DESÓRDENES.... Y EN ESPECIAL A JULIETA POR TODA SU AYUDA, TIEMPO Y APOYO EN ESTA MEMORIA.

A FONDECYT POR LA OPORTUNIDAD Y EL FINANCIAMIENTO DE ESTA MEMORIA

A MIS AMIGOS MARIANNE, PAOLA, ALE, CHELA, CAROLA, ALEX, GONZALO, HUASO, PANCHO Y MUCHOS OTROS QUE ME ACOMPAÑARON EN ESTOS AÑOS DE ESTUDIO Y CARRETE, OJALA SEAN MUCHOS AÑOS MÁS.

A CELSO, JORGE, JACK, DANIEL, MARCELO, CAROLA, CARLOS Y MUCHOS OTROS AMIGOS POR SU VALIOSA AMISTAD DE MUCHOS AÑOS.

FINALMENTE PERO MUY IMPORTANTE, A LA MUJER DE MI VIDA FIORELLA, GRACIAS POR TODO TU AMOR COMPRENSIÓN Y ETERNO E INCONDICIONAL APOYO, GRACIAS MI AMOR...

ÍNDICE

Agradecimientos	iii
Lista de Figuras	vi
Lista de Tablas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Materiales & Métodos	9
Sitio de estudio	9
Extracción del DNA genómico de las muestras de suelo	11
Cuantificación del DNA	11
Amplificación del DNA de suelo por PCR	11
Obtención de perfiles de T-RFLP	13
Análisis de electroferogramas	14
Análisis de correspondencia (CA) y análisis de correspondencia canónica (CCA)	15
Base de datos de secuencias del 16S rDNA	16
Determinación de los parámetros edáficos	16
Estimación de la biodiversidad	17
Resultados	18
Extracción de DNA genómico & amplificación del 16S rDNA	18
Perfiles de T-RFLP y reproducibilidad del método	19
Comparación de las comunidades bacterianas caracterizadas por sus perfiles de T-RFLP	20
Análisis de correspondencia (CA) y análisis de correspondencia canónica (CCA)	23

Comparación de la diversidad de las comunidades microbianas según su origen	25
Composición de las comunidades microbianas	30
Índice de Diversidad	33
Discusión	34
Utilización del marcador 16S rDNA y del método T-RFLP para evaluar la diversidad bacteriana	34
<i>Amplificación del rDNA 16S y limitaciones del PCR</i>	34
<i>Perfiles de T-RFLP</i>	35
Efecto de la rizósfera sobre la diversidad de la comunidad bacteriana	37
Factores edáficos	38
Diversidad de la Comunidad bacteriana total	39
Conclusiones	42
Bibliografía	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Sitio de muestro "El Romeral", Cajón del Maipo, mapa del sitio de recolección de las muestras y tabla de las muestras recolectadas	10
FIGURA 2.	Amplificación del gen del RNA ribosomal 16S mediante PCR	12
FIGURA 3.	Esquema del método de T-RFLP	14
FIGURA 4.	Gel del DNA genómico derivado de muestras de la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal	18
FIGURA 5.	Amplificación del marcador molecular 16S rDNA en las muestras de la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal	19
FIGURA 6.	Electroferograma en triplicado para determinar la reproducibilidad y confiabilidad de los "DNA fingerprinting" del método T-RFLP	20
FIGURA 7.	Dendrogramas de la comunidad total de las muestras asociadas al suelo y la rizósfera de las plantas actinorrícicas y no actinorrícicas	22
FIGURA 8.	Análisis estadístico multivariado de correspondencia (CA) de la comunidad total de las muestras de suelo y rizósfera	23
FIGURA 9.	Análisis estadístico multivariado de correspondencia canónica (CCA), para el mes de Mayo y Octubre de la comunidad total de las muestras de suelo y rizósfera	25
FIGURA 10.	Análisis estadístico multivariado de correspondencia canónica (CCA), de la comunidad total	26
FIGURA 11.	Distribución de los TRFs en los tres sitios de estudio: rizósfera de <i>C. hystrix</i> , rizósfera no actinorrícica y suelo sin cobertura vegetal	28
FIGURA 12.	Dendrograma euclidean construida con las abundancias relativas de la comunidad microbiana obtenida de los electroferogramas de cada muestra	29
FIGURA 13.	Frecuencia relativa de los TRFs más significativos de los electroferogramas de la comunidad total del mes de Mayo y Octubre	31
FIGURA 14.	Porcentaje de identificación de clases microbianas mediante el programa MICA, para ambos meses de muestreo	32

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.	Parámetros edáficos analizados y metodología utilizada para su determinación.	12
TABLA2.	Determinación de los micronutrientes: contenido de materia orgánica, pH, nitrógeno, fósforo y potasio en la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal	24
TABLA3.	Índice de diversidad de la comunidad bacteriana determinada de acuerdo al índice de Shannon a partir del análisis de los perfiles de T-RFLP	33

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA.	Seroalbúmina bovina
dNTP.	Desoxiribonucleótido trifosfato
EDTA.	Ácido etilendiaminotetracético
CA.	Correspondence analysis (análisis de correspondencia)
CCA.	Canonical correspondence analysis (análisis de correspondencia canónica)
MICA.	Microbial community analysis (análisis de la comunidad microbiana)
MVSP.	Multi-Variate Statistical Package (paquete de estadística multivariada)
PCR.	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
<i>rrn</i> .	Operón ribosomal
TAE.	Tris-ácido acético-EDTA
TBE.	Tris-borato-EDTA
T-RFLP.	Terminal restriction fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
TRFs.	Terminal restriction fragment (Fragmentos terminales de restricción)
Tris.	Tris (hidroximetil) aminoetano
UPGMA.	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas).

RESUMEN

La rizósfera puede influir sobre la microbiota del suelo afectando diversos parámetros bióticos y abióticos de su entorno, produciendo cambios en la estructura (composición y abundancia) de la comunidad bacteriana total que la distinguen de la microbiota del suelo sin cobertura vegetal.

Para este estudio se recolectaron un total de nueve muestras de suelo correspondientes a la rizósfera actinorrícica (*Colletia hystrix*), de plantas no actinorrícicas, y suelo sin cobertura vegetal durante los meses de Mayo y Octubre del 2004 en la localidad de "El Romeral", Cajón del Maipo. Para determinar la diversidad y estructura de biotipos presentes en la comunidad bacteriana se utilizó el método del T-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción) utilizando como marcador molecular el gen 16S rDNA.

El análisis de los electroferogramas obtenidos mediante T-RFLP revela diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana asociada a la rizósfera comparada con aquella presente en suelo sin cobertura vegetal. El dendrograma y el análisis por correspondencia muestran una tendencia de agrupamiento según el origen de las muestras, observándose tres grupos distintos que corresponden a: rizósfera de plantas actinorrícicas (*Colletia hystrix*), plantas no actinorrícicas y suelo sin cobertura vegetal. Las muestras con mayor diversidad corresponden a suelo sin cobertura vegetal y existe una predominancia de Proteobacterias en todas las muestras. El método del T-RFLP resultó ser confiable y reproducible para este tipo de análisis.

La estructura de las comunidades microbianas en la rizósfera depende del tipo de cobertura vegetal asociada, sin embargo es más compleja en suelo sin cobertura vegetal.

ABSTRACT

The rhizosphere can influence the soil microbiota by exerting an effect on various biotic and abiotic parameters of its surroundings, producing changes in the structure (composition and abundance) of the total bacterial community and distinguishing it from the microbiota in soil without plant cover.

For this study, a total of nine soil samples corresponding to the rhizosphere were collected, actinorhizal (*Colletia hystrix*), non-actinorhizal plants, and soil without plant cover, during the months of May and October of 2004 in the locality of "El Romeral" Cajón del Maipo. In order to determine the diversity and structure of biotypes present in the bacterial community, the T-RFLP method was used (terminal restriction fragment length polymorphism) using the 16S rDNA as a molecular gene marker.

The T-RFLP electropherogram analysis reveals differences in the structure of the associated bacterial community to the rhizosphere compared with that present in soil without plant cover. The dendrograms and the correspondence analyses show that the samples cluster according to their origin. Three different clusters are observed that correspond to: rhizosphere from actinorhizal plants (*Colletia hystrix*), non-actinorhizal plants and soil without plant cover. In addition, the Proteobacterias predominate in the different samples. The samples with a greater diversity correspond to soil without plant cover. The T-RFLP method was useful and reproducible for this type of analysis.

The structure of the microbial communities in the rhizosphere depends on the type of plant cover associated; nevertheless it is more complex in soil without plant cover.

INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas son complejos ensambles integrados de poblaciones de microorganismos que se encuentran e interactúan dentro de un hábitat determinado. Las funciones que realizan los microorganismos son esenciales para el funcionamiento y mantención de los ecosistemas. Ellos aumentan la fertilidad del suelo ya que participan en procesos tan importantes como los ciclos biogeoquímicos, regulación de poblaciones de la microfauna, interacciones con macroorganismos, entre otros procesos (Kennedy & Smith, 1995; Hawksworth, 1996; Kennedy & Gewin, 1997). Los microorganismos son también centrales en el reciclaje de carbono y otros nutrientes (Ward, 2002), descomposición de materia orgánica (Zak *et al.*, 1994) y desintoxicación de muchos ambientes contaminados (Lamar & Dietrich, 1990). Su versatilidad metabólica y la capacidad de crecer en un amplio rango de factores ambientales tales como temperatura, pH, salinidad (Ovreas, 2000) y oxígeno (Ludemann *et al.* 2000), les permite realizar numerosas funciones y colonizar diversos hábitats. Los microorganismos cumplen un rol central en el mantenimiento de la biósfera por su participación en los flujos de energía y materia de los ecosistemas. Por lo tanto, cambios en la diversidad de las comunidades microbianas o en las actividades que ellas realizan, podrían tener un efecto inmediato o retardado en el funcionamiento de los ecosistemas (Zak *et al.*, 1994).

La ecología microbiana estudia las interacciones de los microorganismos con el ambiente y cómo los factores bióticos y abióticos afectan los patrones de diversidad y función de los ensambles microbianos en el tiempo y en el espacio.

La diversidad microbiana describe la complejidad y la variabilidad en los diferentes niveles biológicos de organización en términos de su riqueza (¿qué hay?) y abundancia (¿cuántos hay?) (Dunbar & Kuske, 1999). Por lo tanto, para realizar un análisis comparativo de una comunidad microbiana compleja se deben tomar en cuenta estos dos parámetros (Torsvik & Øvreås, 2002).

Los estudios comparativos de las comunidades microbianas en ambientes naturales son difíciles de realizar por la complejidad de los ensamblajes microbianos y por la falta de métodos directos para determinar su diversidad y composición. La mayor dificultad es que una gran proporción de microorganismos son difíciles de aislar y cultivar en laboratorio, se estima que menos del 1% son cultivables (Amman *et al.*, 1995; Blackwood *et al.*, 2003), entregando una visión sesgada de la diversidad biológica presente en ambientes naturales.

Para superar estas dificultades, se han desarrolladas técnicas moleculares para tipificar y cuantificar microorganismos a partir de muestras ambientales (Picard *et al.*, 1992; Øvreås, 2000; Schloter *et al.*, 2000; Fredlund *et al.*, 2001). Estas técnicas están basadas en el uso de marcadores moleculares que permiten rastrear la presencia de los microorganismos en una muestra ambiental.

Para este estudio se utilizó el gen que codifica el RNA ribosomal 16S (rDNA 16S), como marcador molecular. Este gen es el más adecuado para el análisis de diversidad en comunidades microbianas, ya que presenta ventajas sobre el resto de los marcadores moleculares en cuanto a su ubicuidad, baja tasa de transferencia horizontal y diferentes tasas de variación (dominio a género) (Weisburg, *et al.*, 1991).

La aproximación por técnicas moleculares basadas en análisis del rDNA 16S tales como la clonación, secuenciación, y técnicas de *fingerprinting* como la electroforesis en gel de gradiente desnaturalante (DGGE) o el polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP), han sido una alternativa para caracterizar la diversidad microbiana presente en muestras ambientales.

El método del T-RFLP (Liu *et al.*, 1997; Marsh *et al.*, 2000; Osborn *et al.*, 2000), permite obtener un perfil del rDNA 16S de una muestra ambiental a partir del cual se tiene una aproximación de la estructura de la comunidad microbiana presente en la muestra. El método está basado en la amplificación por PCR de un marcador molecular como el 16S rDNA, usando uno de los extremos marcado en su extremo 5' con una molécula fluorescente. El producto amplificado y marcado en uno de sus extremos es posteriormente digerido con una enzima de restricción. Los fragmentos terminales de restricción (TRFs) marcados, son separados por electroforesis capilar. Los perfiles de T-RFLP proporcionan datos cuantitativos sobre cada TRF detectado, incluyendo tamaño en pares de bases e intensidad de fluorescencia. Por lo tanto provee un acercamiento de mayor resolución a las comunidades bacterianas presentes en muestras ambientales. Este método permite la rápida comparación de la diversidad de secuencias de DNA bacteriano (Marsh *et al.*, 1999) y puede ser utilizado para la diferenciación y comparación de las comunidades microbianas presentes en una muestra ambiental (Dunbar & Kuske, 2000).

Comunidades Bacterianas del suelo y la rizósfera

Una comunidad microbiana es un ensamble integrado de poblaciones de microorganismos que se encuentran e interactúan dentro de un hábitat determinado, como son el suelo y la rizósfera.

El suelo es un sistema muy complejo que comprende una variedad de microhábitats con diferentes gradientes fisicoquímicos y condiciones ambientales discontinuas, por lo que da lugar para el desarrollo de muchas interacciones entre los organismos presentes. Un gramo de suelo puede albergar sobre 10 billones de microorganismos de millares de especies diferentes (Torsvik, 2002). Sin embargo, está estimado que menos del 1% de estos microorganismos son cultivables usando técnicas estándares de cultivo (Amman *et al.*, 1995). Estudios basados en técnicas moleculares independiente de cultivo revelan que las comunidades bacterianas del suelo pueden ser descritas por un perfil de DNA comunitario, el cual se relaciona con el origen de la muestra (Mahaffee & Kloepper, 1996; Kuske *et al.*, 2002).

Por su parte, la rizósfera es el volumen de suelo adyacente e influenciado por la raíz de la planta (Kent & Triplett, 2002). La rizósfera es una zona de interacciones predominantemente comensalistas y mutualistas entre plantas y microorganismos. Las raíces excretan varios compuestos orgánicos, cuya composición y cantidad varía entre las distintas especies vegetales y se modifica durante el desarrollo de la planta (Hale *et al.*, 1978, Kuske *et al.*, 2002). Como resultado de esto las comunidades microbianas en la rizósfera, que pueden usar estos sustratos orgánicos, difieren en composición y densidad, dando origen a una microbiota específica asociada a cada especie vegetal (Miller *et al.*, 1989; Duineveld *et al.*, 2001, Kuske *et al.*, 2002).

El propósito de esta memoria es caracterizar el efecto de la rizósfera de plantas actinorrícicas como *C. hystrix* en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. Las plantas actinorrícicas son un grupo heterogéneo de árboles pequeños o arbustos leñosos que establecen simbiosis con *Frankia*, un actinomicete fijador de nitrógeno. Estas plantas se desarrollan en diversos hábitats desde las tundras árticas a las regiones templadas y tropicales. Frecuentemente se establecen como vegetación pionera en suelos marginales por su capacidad para fijar nitrógeno a través de los nódulos radiculares inducidos por *Frankia*. Sin embargo, muchas plantas tienen la capacidad de persistir como especies dominantes o componentes más estables en las comunidades vegetacionales (Benoit & Berry, 1990). Para el sistema de estudio se utilizó la rizósfera de *Colletia hystrix* perteneciente a la familia Rhamnaceae. Esta especie forma parte del matorral esclerófilo de Chile Central y su valor como mejorador de la fertilidad del suelo depende en parte de la capacidad de fijar nitrógeno a través del microsimbionte (*Frankia*). Esta interacción mutualista es una importante fuente de ingreso de nitrógeno al suelo en forma de amonio, por lo tanto la rizósfera de *C. hystrix* podría definir una estructura y composición de la comunidad microbiana diferentes a aquellas establecidas en el suelo sin cobertura vegetal y en la rizósfera de plantas no actinorrícicas.

Hasta la fecha no hay estudios sobre la microbiota asociada a la rizósfera actinorrícica. Además, existe poca información sobre la heterogeneidad espacial en la comunidad bacteriana del suelo y los cambios en respuesta a las diferentes condiciones ambientales.

El objetivo principal de esta memoria es determinar efectos de la rizósfera de *Colletia hystrix* sobre la comunidad bacteriana del suelo utilizando el marcador molecular 16S rDNA, mediante el método de T-RFLP, siendo los objetivos específicos:

i) Determinar patrones de T-RFLP de la comunidad bacteriana total comparando rizósferas de plantas actinorrícicas, plantas no actinorrícicas y suelo sin cobertura vegetal

ii) Relacionar los perfiles T-RFLP con los parámetros edáficos del sitio de estudio.

Basados en los estudios sobre diversidad de las comunidades microbianas del suelo se propone la siguiente HIPÓTESIS: La rizósfera actinorrícica afecta la estructura de la comunidad bacteriana asociada, lo que permite su diferenciación de otras muestras de suelo.

MATERIALES & MÉTODOS

Sitio de estudio

El sitio de estudio se ubica en la localidad de "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo (Figura 1A) y comprende un área de 14 m x 18 m (Figura 1B). Esta localidad es parte del matorral esclerófilo de Chile Central con predominio de la planta actinorrófica *Colletia hystrix*. Las muestras de suelo utilizadas en este estudio se recolectaron por triplicado a partir de la rizósfera de plantas de *Colletia hystrix*, rizósfera de plantas no actinorróficas y suelo sin cobertura vegetal, durante los meses de Mayo y Octubre del 2004 (Figura 1C)

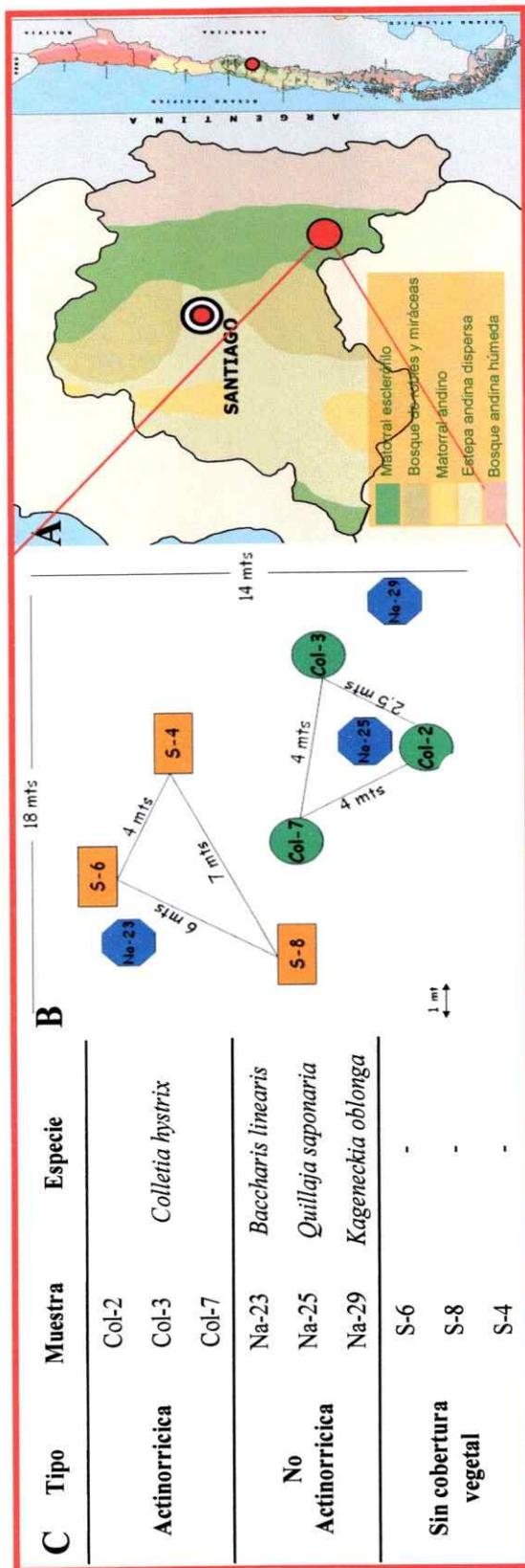


Figura 1: (A) Mapa del sitio de estudio "El Romeral", Cajón del Maipo. (B) Distribución de las muestras en el lugar de recolección, en el cual ● representa las muestras actinorrícas, ● las muestras no actinorrícas y □ suelo sin cobertura vegetal. (C) Lista de las muestras recolectadas. Col: rizósfera de *Colletia hystrix*; Na: rizósfera no actinorríca; S: suelo sin cobertura vegetal.

Extracción del DNA genómico de las muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron almacenadas a -20°C en bolsas semipermeables estériles hasta su procesamiento, el DNA se obtuvo a partir de 0.25g de suelo empleando el Kit de extracción "Ultraclean Soil DNA" (MoBio laboratorios, Inc. www.mobio.com). El DNA obtenido se resuspendió en 50 uL de buffer TE y se guardó a -20°C hasta su análisis.

Cuantificación del DNA

La concentración y calidad del DNA se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM pH 8.0, EDTA 1mM) y se visualizó por tinción con Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml), comparándolo con cantidades conocidas del marcador de peso molecular λ / *Hind*III (Gibco BRL®).

Amplificación del DNA del suelo por PCR

Para amplificar el DNA ribosomal 16S se utilizaron los partidores fD1 5'-AGAG TTT GAT CCT GGC TCA G -3' y rP2 3'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -5' (Weisburg *et al.*, 1991). Para el análisis de T-RFLP se utilizó uno de los partidores marcados con carboxifluoresceína en su extremo 5'. Para detectar los TRFs 5' del amplicón se utilizó el partidor fD1 marcado y para los TRFs 3' se utilizó el partidor rP2 marcado (Figura 2). En cada reacción, la mezcla de PCR contenía 50 μ M MgCl₂, 10 mg/ml BSA (Gibco BRL®), 120 uM de cada dNTP, 10 uM de cada partidor y 2.5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen®) en buffer PCR obteniendo un volumen de 24 μ l al que se

le adicionó 1 μ l de la muestra de DNA (generalmente diluida 1/20). De cada muestra de suelo se realizaron 8 réplicas para su posterior purificación.

Las reacciones tienen un volumen final de 25 μ l y fueron amplificadas en un termociclador GeneAmp PCR system (Perkin Elmer). El programa consistió en un ciclo térmico de: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, luego 30 ciclos de desnaturalización a 94° por 1 minuto, hibridación a 57°C por 30 seg, y una extensión a 72°C por 2 minutos, terminando con una extensión final a 72°C por 7 minutos. El producto se cuantificó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X teñido con Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml), el tamaño del amplicón se determinó por comparación con un estándar de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL).

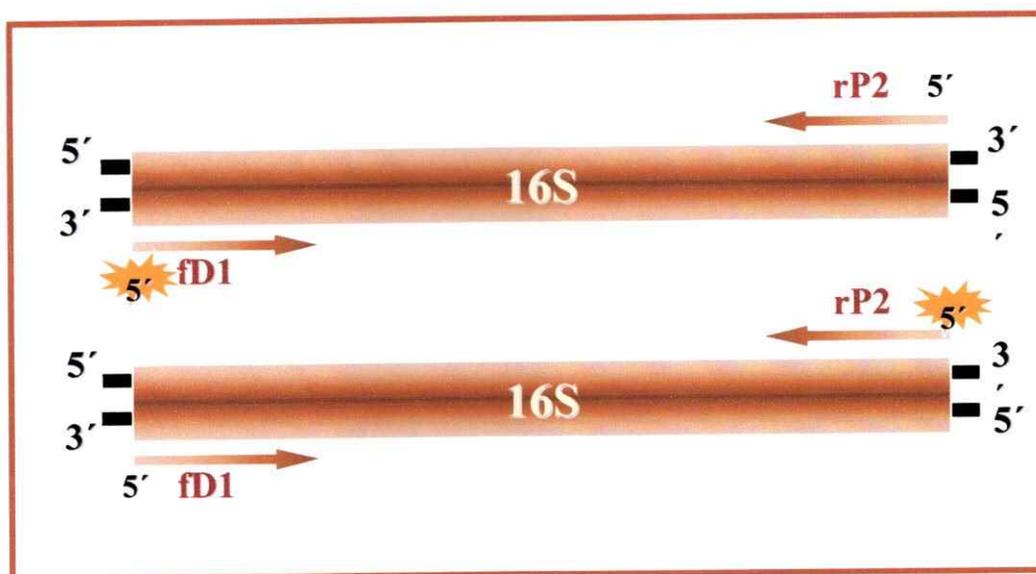


Figura 2. Esquema de la amplificación del gen del RNA ribosomal 16S mediante PCR, utilizando los partidores fD1 y rP2 marcados en reacciones independientes.

Obtención de perfiles de T-RFLP

Para la purificación de los amplicones se utilizó el kit de limpieza "UltraClean PCR Clean-up" (MoBio Laboratorios[®], Inc., www.mobio.com). Se utilizaron 8 tubos de reacción por cada muestra para obtener alrededor de 100 µl por muestra. El producto purificado se cuantificó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml). La mezcla de amplicones fue digerida con la enzima de restricción *HaeIII* (Invitrogen[®]) durante 3,5 hs a 37°C, según las condiciones recomendadas por el fabricante y se resolvió por electroforesis capilar en un secuenciador de DNA Genetic Analyzer ABI-310 (Applied Biosystem). El procedimiento general de la metodología se esquematiza en la Figura 3. Para cada muestra se generó un electroferograma donde se observa el número de TRFs de cada muestra (riqueza) y la fluorescencia de cada TRF (abundancia). La longitud de los TRFs marcados se determinó por comparación con estándares internos empleando el programa GeneScan 3.1.2 (ABI). Cada réplica de la muestra ambiental fue caracterizada por 2 electroferogramas de T-RFLP, uno correspondiente a los tTRFs 3' generados por la digestión con *HaeIII* y el otro correspondiente a los TRFs 5' obtenidos con *HaeIII*.

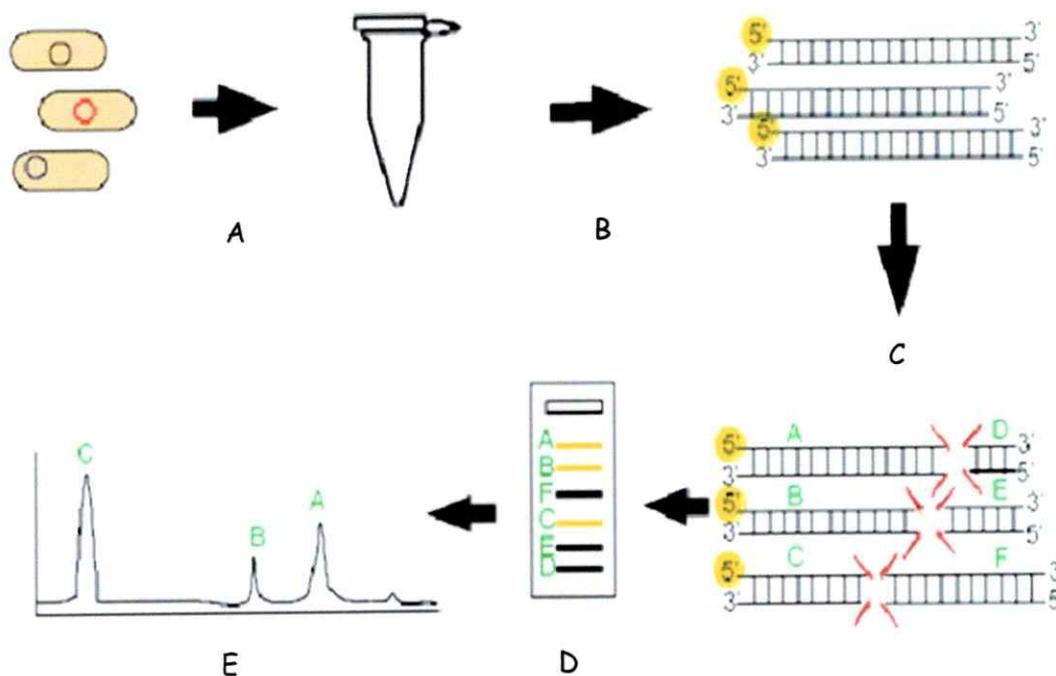


Figura 3. Representación del método de TRFLP: A. Extracción del DNA de las muestras de suelo; B. Amplificación del gen que codifica el RNA ribosomal 16S mediante PCR con partidor marcado; C. Digestión del producto de PCR con una enzima de restricción; D. Separación de los TRFs por electroforesis capilar; E. Electroferograma.

Análisis de electroferogramas

La similitud de las comunidades en estudio se estimó por comparación de los electroferogramas. Los electroferogramas se estandarizaron en base a cinco criterios: (i) alineamiento de los perfiles en relación al tamaño molecular, (ii) establecimiento de un rango de pares de bases (pb) entre 20 – 310 para la comparación (iii) identificación de las bandas significativas (TRF mayor o igual a 30 UF), (iv) normalización de las unidades de fluorescencia, (v) conversión de los "fingerprinting" moleculares generados para cada comunidad a datos binarios (matriz de presencia o ausencia de banda de DNA o TRF).

Para comparar la diversidad de las diferentes comunidades, primero se calculó la distancia entre las muestras mediante el Índice de Coincidencia Simple (*Simple Matching*). Posteriormente se construyeron los dendrogramas a partir de las matrices de distancia usando el análisis de ligamiento, promediando todas las distancias entre las muestras mediante un algoritmo de distancia UPGMA (Unweighted Pairs Group Method with Arithmetic Average) y generando valores de *bootstrap* sobre mil réplicas mediante el programa TREECON (Van de Peer & De Wachter, 1994).

Las muestras en su mayoría se analizaron en triplicado desde la digestión, solo una muestra fue realizada en triplicado desde la extracción del DNA, para determinar la reproducibilidad del método y confiabilidad de los "fingerprinting".

Se realizó también un dendrograma de distancia euclideana de la comunidad microbiana, construida con las abundancias relativas de cada TRF obtenidas de los electroferogramas del total de las muestras. Se utilizó el algoritmo de UPGMA mediante el programa MVSP (*Multi-Variate Statistical Package*) (Kovach, 2001).

Análisis de correspondencia (CA) y análisis de correspondencia canónica (CCA)

El Análisis de Correspondencia (CA) se utilizó para confirmar los agrupamientos de las muestras obtenidos en el análisis de agrupamiento (Ter Braak, 1985). El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) se utilizó para relacionar la diversidad de la comunidad microbiana con los parámetros edáficos del sitio de estudio (Ter Braak, 1986), en donde los puntos representan las muestras y los vectores las variables ambientales. Para estos análisis se utilizó el programa MVSP (Kovach, 2001).

Base de datos de secuencias del 16S rDNA

Para la identificación de los posibles filotipos presentes en la muestra se utilizó el programa de simulación MICA (<http://hermes.campus.udaho.edu>). Buscando coincidencias entre la base de datos y los fragmentos terminales obtenidos con el partidor marcado fD1, confirmando los datos con los fragmentos terminales obtenidos con el partidor rP2 marcado.

Determinación de los parámetros edáficos

La determinación de los parámetros edáficos se efectuó por métodos estándares en el laboratorio de diagnóstico del INIA (Instituto de Investigación Agropecuaria). A cada muestra de suelo se le determinó: pH, contenido de materia orgánica, nitrógeno, potasio y fósforo. La metodología usada en la determinación de los parámetros edáficos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros edáficos analizados y metodología utilizada para su determinación.

Parámetro	Métodos
pH	Suspensión y determinación potenciométrica.
Materia Orgánica	Combustión húmeda y determinación colorimétrica del cromato reducido.
Nitrógeno	Nitrógeno disponible: Digestión de Kjeldahl.
Fósforo	Extracción con solución de bicarbonato de sodio 0,5 mol/L a pH 8,5 y determinación colorimétrica del azul de molibdeno.
Potasio	Extracto de saturación y espectrofotometría de absorción y emisión atómica.

Estimación de la Biodiversidad

La estimación de biodiversidad de la comunidad microbiana total se realizó mediante el Índice de Shannon-Weaver, sensible a la riqueza y abundancia relativa de especies (Shannon & Weaver, 1963) utilizando la transformación Log base 10 en la siguiente ecuación:

Índice de diversidad Shannon-Weaver (H)

$$H = C (N \log N - \sum n_i \log n_i)$$

donde: C = 2.3; N = número de individuos; n_i = número de individuos de la especie i.

RESULTADOS

Extracción de DNA genómico y amplificación del 16S rDNA

El DNA extraído desde muestras de la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal se sometió a electroforesis para su determinación cuantitativa y cualitativa (Figura 4).

La diversidad genética de las 18 muestras ambientales se evaluó mediante la amplificación del marcador molecular 16S rDNA, el producto de la amplificación se muestra en la Figura 5 junto a un control positivo y un control negativo y comparado con el marcador de peso molecular 100 pb ladder. Se observa la banda del tamaño esperado (~1500 pb) y la ausencia de bandas inespecíficas.

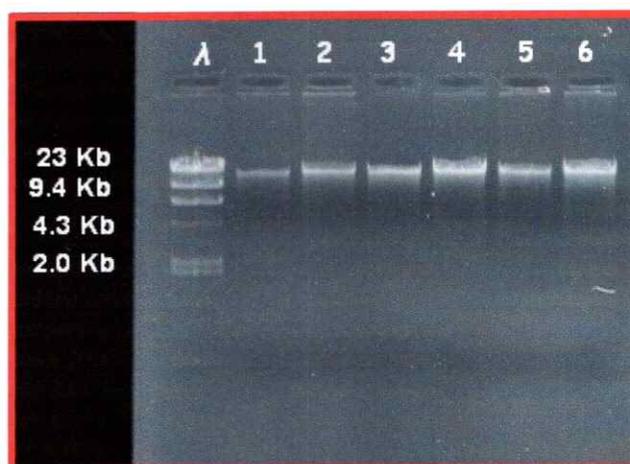


Figura 4. Gel de agarosa al 0.8% p/v. Pocillos 1 & 2: muestras actinorrícicas, pocillos 3 & 4: muestras no actinorrícicas y pocillos 5 & 6: muestras sin cobertura vegetal. λ : marcador de peso molecular λ /Hind III

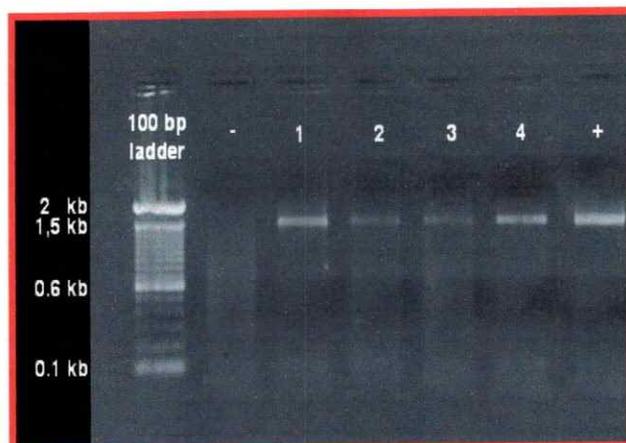


Figura 5. Gel de agarosa al 1.2% p/v. Pocillos 1 - 4: rDNA 16S amplificado a partir de muestras ambientales; (-): control negativo; (+): control positivo. 100 bp ladder: marcador de peso molecular.

Perfiles de T-RFLP y reproducibilidad del método

A partir del DNA total de cada muestra de suelo y rizósfera se determinó un perfil de T-RFLP correspondiente a los terminales de restricción de los extremos 5' y 3' de la región genómica del rDNA 16S. Para establecer la reproducibilidad de los perfiles de T-RFLP, cada muestra fue procesada en triplicado desde la digestión. En la Figura 6 se muestran los electroferogramas obtenidos para una muestra ambiental la cual fue procesada por triplicado desde la extracción de DNA genómico. Los perfiles son idénticos en cuanto a los fragmentos que se analizan observándose pequeñas diferencias en la altura (fluorescencia) de los picos que representan menos del 5% de la fluorescencia total.

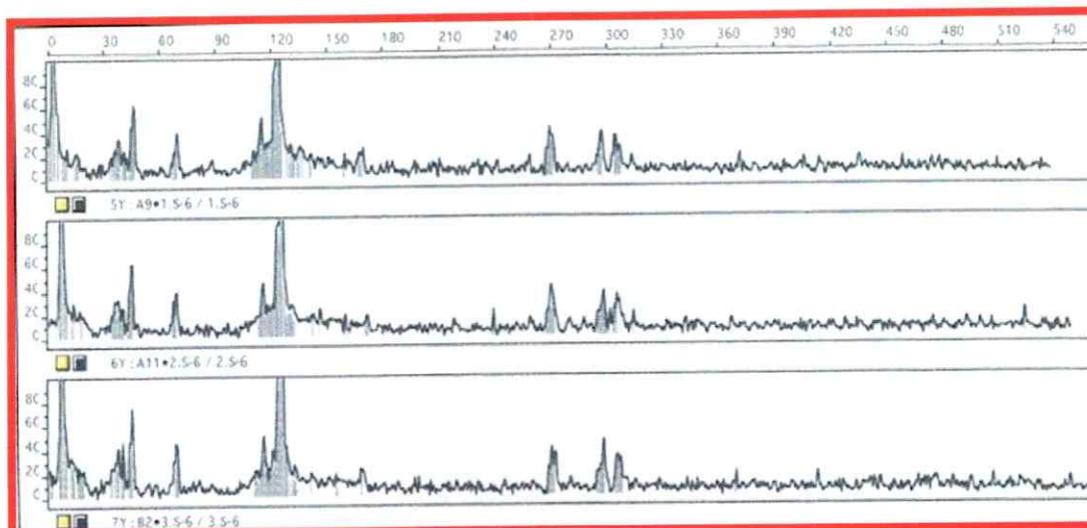


Figura 6. Electroferograma en triplicado para determinar la reproducibilidad y confiabilidad de los "DNA fingerprinting" del método T-RFLP.

Comparación de las comunidades bacterianas caracterizadas por sus perfiles de T-RFLP

Cada muestra se caracterizó por los dos perfiles de T-RFLP generados por los terminales de restricción 5' y 3' del rDNA 16S. Para la comparación cada perfil se convirtió en una matriz binaria de presencia/ausencia de fragmentos terminales. Estos fragmentos corresponderían potencialmente a un filotipo bacteriano presente en la muestra. El siguiente análisis no considera la fluorescencia relativa de los fragmentos, es decir no considera la abundancia relativa de éstos sino la riqueza de cada muestra, representadas por matrices binarias de 0/1.

La Figura 7 muestra los dendrogramas basados en el análisis de los electroferogramas obtenidos para el rDNA 16S de las muestras ambientales. Para el mes de Mayo (Figura 7A), existe un claro agrupamiento de las muestras actinorrícicas, con una distancia menor a 0,3 y un *bootstrap* de 84%, las rizósfera no actinorrícica se agrupa con un *bootstrap* del 97% y una similitud cercana al 75%. En las muestras de suelo sin

cobertura vegetal existe una mayor diferencia entre ellas. Las muestras S-6 y S-8 se agrupan el 100% de las veces, pero la muestra S-4 cae fuera del grupo, aunque tampoco se asocia a otros agrupamientos.

En las muestras de Octubre (Figura 7B), las muestras actinorrícicas muestran un agrupamiento similar al de Mayo pero con una mayor similitud entre ellas (cerca a 80%) aunque el valor de *bootstrap* es menor que el obtenido para las muestras de Mayo. No se observa una separación de las muestras no actinorrícicas y actinorrícicas. Sin embargo, las comunidades bacterianas de las rizósferas se diferencian claramente de las comunidades bacterianas que se desarrollan en el suelo sin cobertura vegetal. Estas últimas forman un grupo bien definido con un porcentaje de asociación del 99%. Entre las muestras de suelos sin cobertura vegetal se observa una mayor heterogeneidad, comparadas con las muestras rizobiales, su disimilitud es cercana a 0,35. Cabe destacar que en las muestras de octubre, el 100% de las veces, las muestras sin cobertura vegetal se separan de las muestras de la rizósfera.

Al analizar los datos en conjunto sin considerar la variable tiempo, se obtuvo el dendrograma de la figura 7C, en el cual se observa que las muestras se agrupan de acuerdo a su origen en i) rizósfera actinorrícica, ii) rizósfera no-actinorrícica y iii) suelo sin cobertura vegetal. Cada grupo presentan un alto valor de *bootstrap* con un 82% de asociación de todas las muestras actinorrícicas, un 99% de asociación para las muestras no actinorrícicas y un 86% de agrupamiento para las muestras sin cobertura vegetal, lo que indica la robustez del agrupamiento. Además, un 100% de las veces las muestras de la rizósfera se diferencia la rizósfera actinorrícica de la no actinorrícica, y éstas a su vez un 86% de las sin cobertura vegetal.

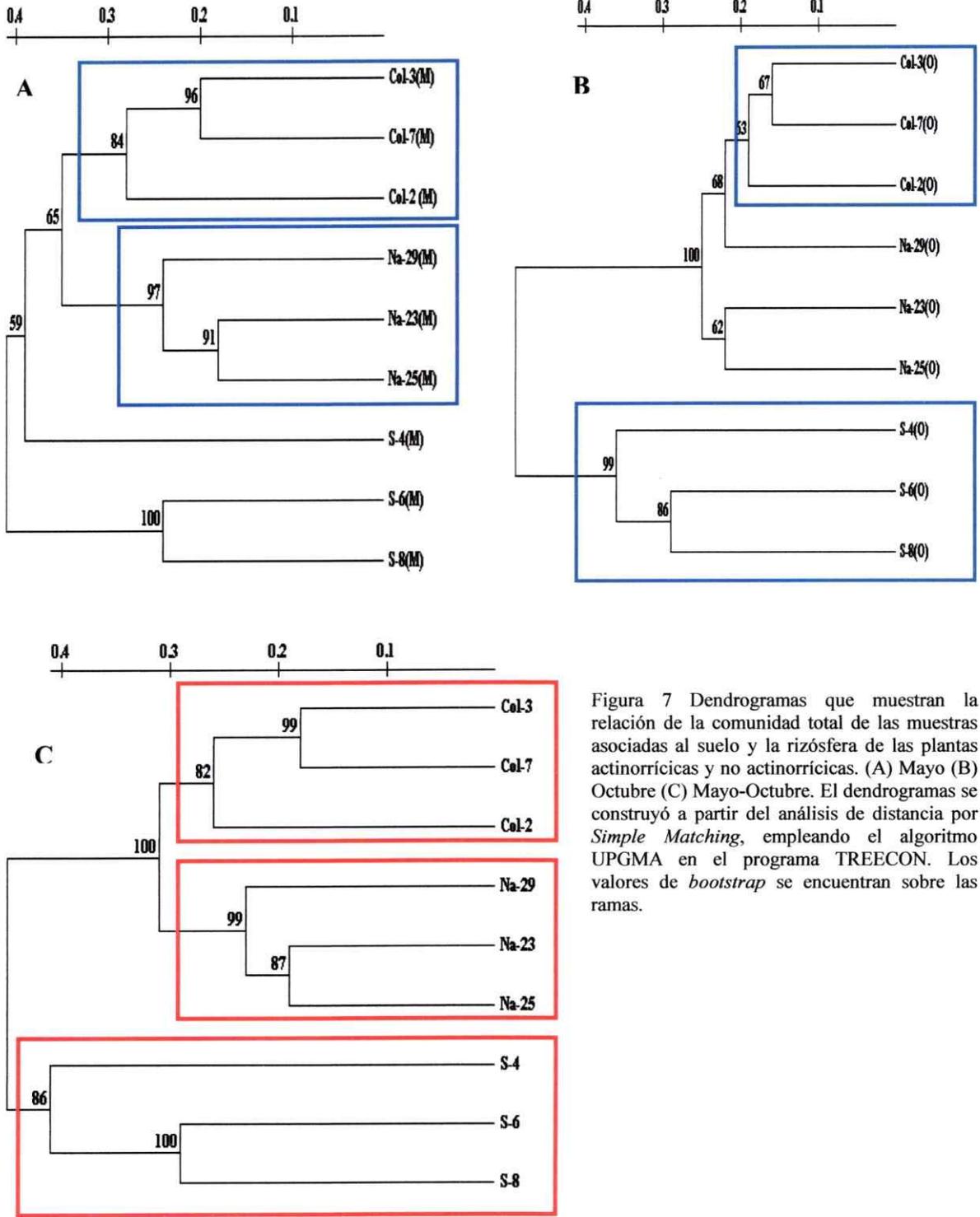


Figura 7 Dendrogramas que muestran la relación de la comunidad total de las muestras asociadas al suelo y la rizósfera de las plantas actinorrícicas y no actinorrícicas. (A) Mayo (B) Octubre (C) Mayo-Octubre. El dendrogramas se construyó a partir del análisis de distancia por *Simple Matching*, empleando el algoritmo UPGMA en el programa TREECON. Los valores de *bootstrap* se encuentran sobre las ramas.

Análisis de Correspondencia (CA) y Análisis de Correspondencia Canónica (CCA)

El análisis de correspondencia (Figura 8) sobre los TRFs de cada sitio estudiado, permitió confirmar los grupos obtenidos por el análisis de agrupamiento de la matriz de distancia esquematizado en los dendrogramas, en el cual los porcentajes de los ejes representan la varianza de las muestras.

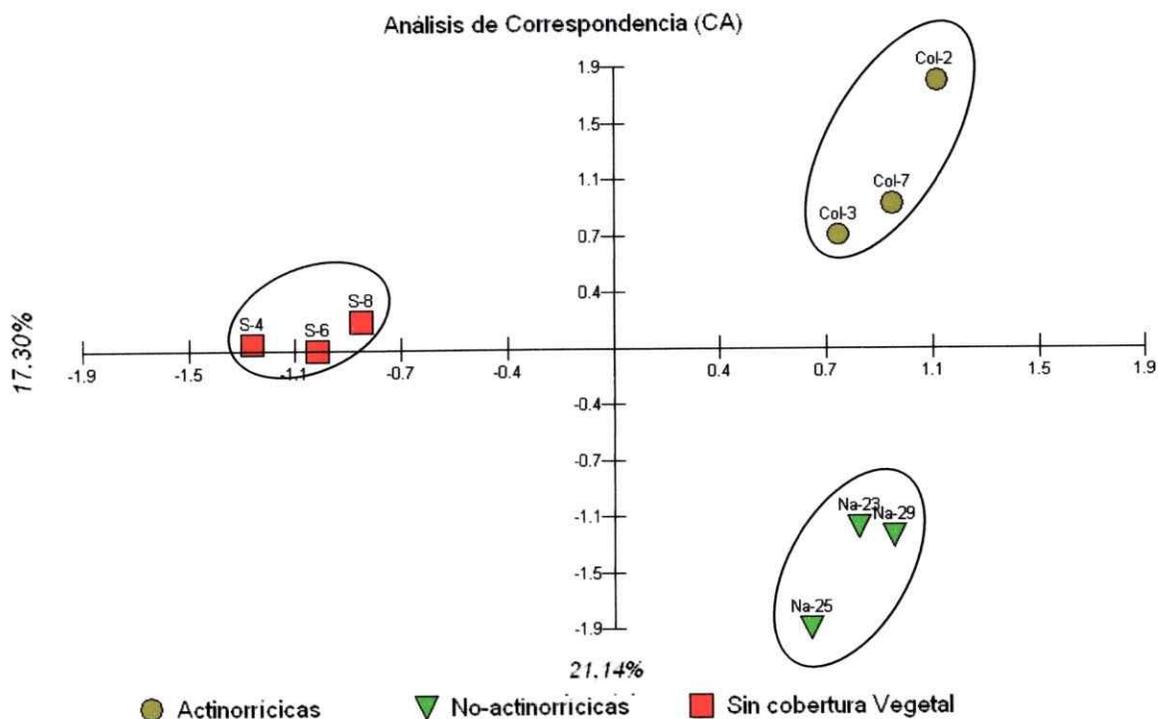


Figura 8. Análisis estadístico multivariado de correspondencia (CA) de la comunidad total de las muestras de suelo y rizósfera, analizadas por T-RFLP. Los porcentajes en los ejes muestran la varianza de las muestras.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros edáficos determinados para cada muestra. El Análisis de Correspondencia Canónica entre la estructura de la comunidad bacteriana y los factores edáficos se muestran en las Figuras 9 y 10.

Tabla 2. Datos de los micronutrientes determinados: contenido de materia orgánica, pH, nitrógeno, fósforo y potasio, en la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal.

	Mayo					Octubre				
	M.O (%)	pH	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	M.O (%)	pH	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)
Col-2	9,1	7,0	70	113	456	5	7,1	26	55	544
Col-3	9,1	7,1	78	50	636	7	7,2	27	108	430
Col-7	4,2	6,9	10	42	314	10	7,3	31	72	518
S-6	4,5	7,4	8	53	336	5	7,2	17	26	278
S-4	5,5	7,1	12	69	332	9	6,9	56	48	382
S-8	5,4	7,1	12	64	376	8	7,1	33	64	402
Na-23	5,8	7,2	68	51	568	6	7,4	11	45	230
Na-25	6	7,2	12	57	646	8,4	7,5	10	39	612
Na-29	4,1	7,0	12	46	584	10	7,6	10	66	780

El CCA relaciona la riqueza microbiana con variables ambientales conocidas, en el cual los puntos representan las muestras, los vectores las variables ambientales y los porcentajes representan cuanto explica el eje de la varianza total. Si las medidas ambientales se relacionan fuertemente con algún eje, se puede predecir que influyen en la variación de la composición de esas muestras. La influencia del vector se refleja en el largo y la cercanía al eje.

En el CCA correspondiente a las muestras de mayo (Figura 9A) se observa una fuerte influencia principalmente de nitrógeno y en menor grado de materia orgánica y pH sobre la agrupación de las muestras actinorrícicas en el eje Y con un 18,4% de varianza. Sobre el eje X se observa una influencia bastante fuerte del potasio sobre las muestras del suelo sin cobertura vegetal con un 15,6% de varianza.

En el CCA correspondiente a las muestras de octubre (Figura 9B) la diferencia entre rizósfera y suelo sin cobertura vegetal se ve influenciada por nitrógeno principalmente y en menor grado por pH y potasio, separando las muestras a lo largo del eje X con un 15,6% de varianza.

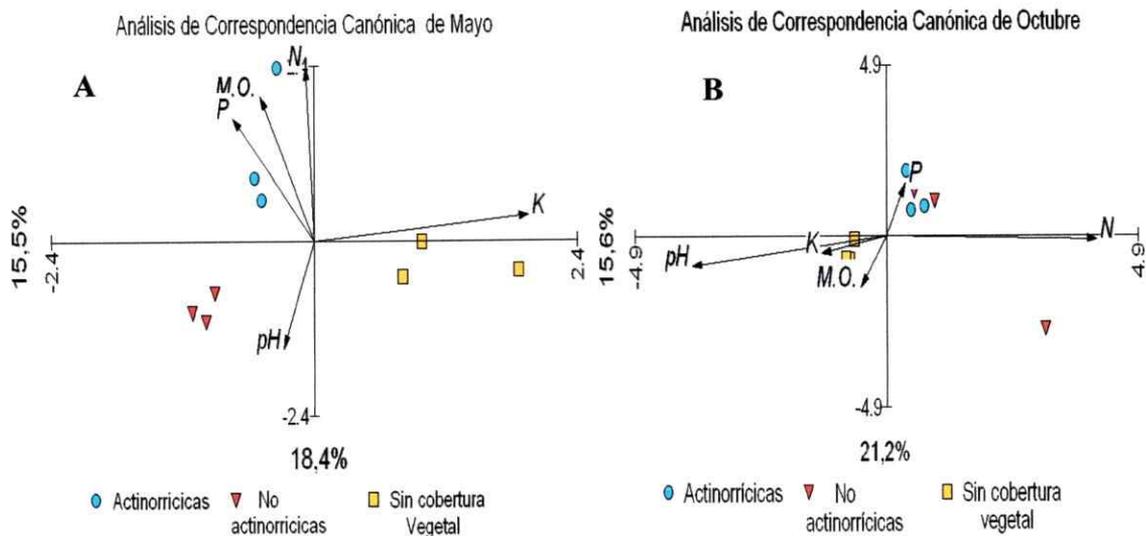


Figura 9. Análisis estadístico multivariado de correspondencia canónica (CCA), para el mes de Mayo (A) y Octubre (B) de la comunidad total de las muestras de suelo y rizósfera analizadas por T-RFLP; P = fósforo; M.O. = materia orgánica; K = potasio; N = nitrógeno y pH.

Comparación de la diversidad de las comunidades microbianas según su origen

En la figura 10 se muestran las abundancias relativas promedio de los fragmentos terminales que caracterizan a las tres comunidades bacterianas en los dos tiempos de muestreo. El análisis de Correspondencia Canónica sugiere que el vector pH principalmente y en menor grado el fósforo, influyen en el agrupamiento de las muestras actinorrícas por un lado y de suelo sin cobertura vegetal por el otro, diferenciándose entre ellas. Por otro lado la materia orgánica influye en la separación de las muestras no actinorrícas a lo largo del eje Y con un 11,24% de varianza.

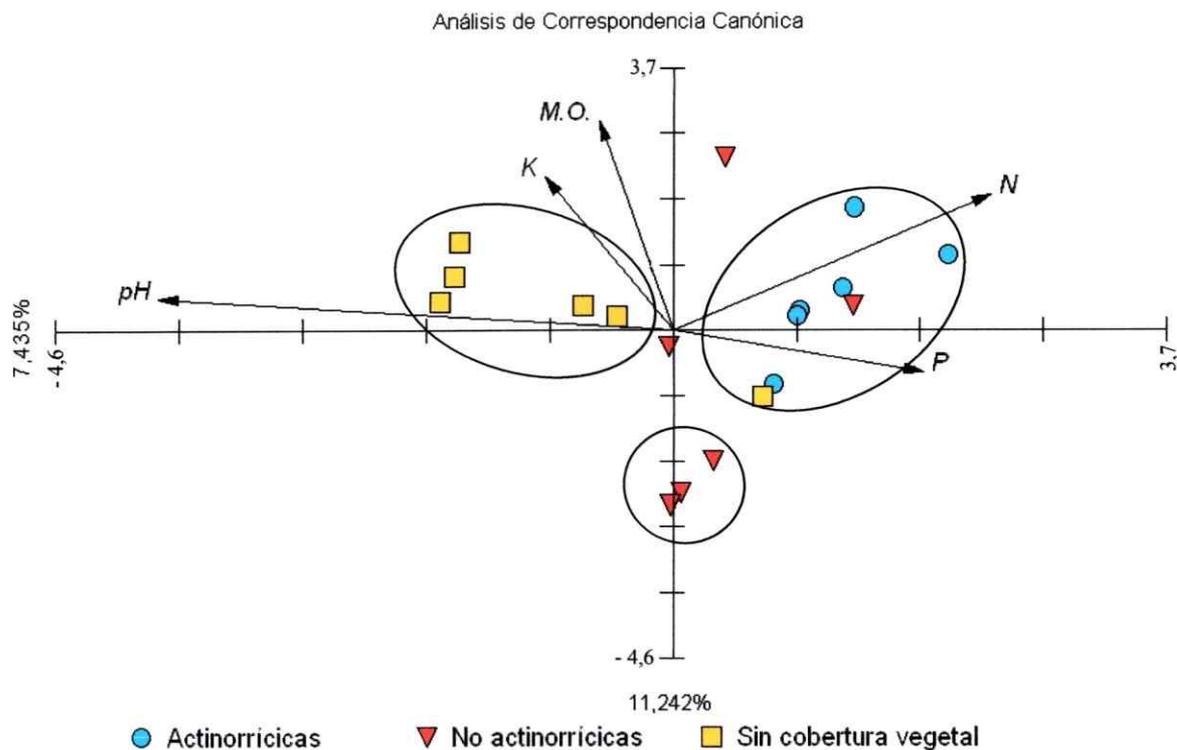


Figura 10. Análisis estadístico multivariado de correspondencia canónica (CCA), de la comunidad total de las muestras de suelo y rizósfera analizadas por T-RFLP en los meses de mayo y octubre. P = fósforo; M.O = materia orgánica; K = potasio; N = nitrógeno y pH.

Los patrones de T-RFLP de la comunidad bacteriana de la rizósfera actinorríca (Figura 11A) correspondiente a las muestras de Mayo y Octubre presentan un total de 52 y 51 TRFs respectivamente. Aunque no existe mayor diferencia en el número de fragmentos, la distribución y porcentaje de éstos varía notablemente en ambos meses. Mayo presenta 4 T-RFs que sobrepasan el 5% de la abundancia relativa, los cuales suman el 45.13% del total de la fluorescencia. En las muestras de Octubre la comunidad bacteriana está principalmente representada por 8 TRFs que sobrepasan el 5% de la abundancia relativa, los cuales corresponden al 49.3% de la fluorescencia total, esto muestra una importante diferencia en la distribución de los TRFs en ambos tipos de muestras. Cabe destacar que el mayor porcentaje de abundancia relativa rodea los 125pb

en el patrón de T-RFLP observado en el mes de Mayo, no así con el patrón de T-RFLP correspondiente a las muestras del mes de Octubre, donde el mayor porcentaje se concentra alrededor de los 307 pb.

La comunidad bacteriana asociada a la rizósfera de plantas no actinorrícicas (Figura 11B) representada por perfiles de T-RFLP, muestran una distribución de fragmentos similar entre los dos tiempos de muestreo, no existe una gran diferencia de fragmentos que sobrepase el 5%, con 3 TRFs dominantes en Mayo y 2 TRFs en Octubre. Sin embargo, los porcentajes que estos TRFs representan son muy distintos, con un 42.09 y 18.66% respectivamente. Además los TRFs más abundantes en la comunidad bacteriana de ambos meses se distribuyen alrededor de los 125 pb.

Con respecto a las muestras sin cobertura vegetal (Figura 11C), la distribución de la abundancia relativa se presenta mucho más homogénea que en los casos anteriores, con un total de 3 TRFs en cada mes que sobrepasan el 5%, correspondientes al 26.08% y 31.59% en los meses de Octubre y Mayo respectivamente. Sin embargo, la riqueza de fragmentos entre las muestras de ambos meses es muy distinta, con un total de 92 TRFs que conforman la comunidad bacteriana en las muestras de suelo de Octubre y 52 TRFs en la comunidad bacteriana del suelo muestreado en Mayo. Cabe destacar que, si bien existe una distribución más homogénea en cada tiempo de muestreo, esta distribución es muy distinta para cada mes.

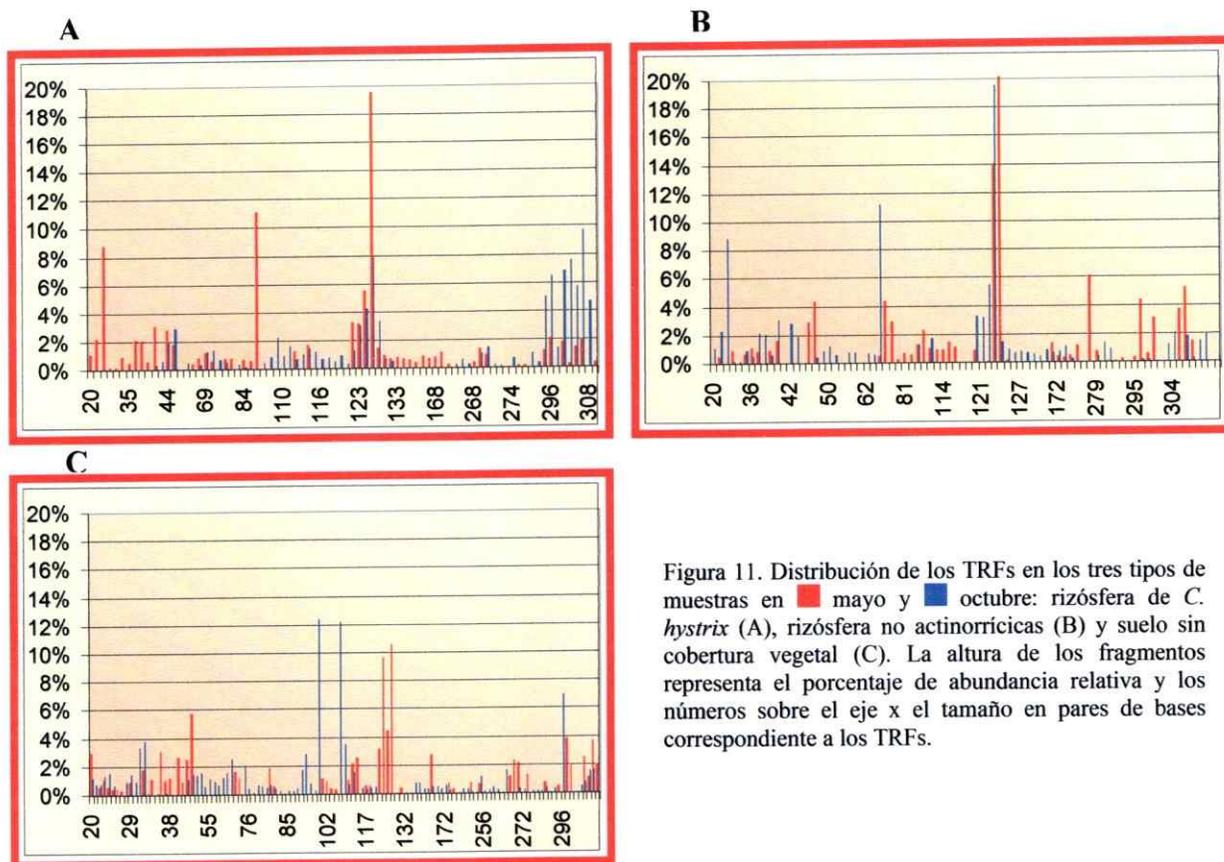


Figura 11. Distribución de los TRFs en los tres tipos de muestras en ■ mayo y ■ octubre: rizósfera de *C. hystrix* (A), rizósfera no actinorrízicas (B) y suelo sin cobertura vegetal (C). La altura de los fragmentos representa el porcentaje de abundancia relativa y los números sobre el eje x el tamaño en pares de bases correspondiente a los TRFs.

Para la comparación de las comunidades bacterianas se utilizó la distancia euclídeana que considera la fluorescencia relativa de cada TRF, lo cual podría asimilarse a la abundancia relativa de cada filotipo. En la Figura 12 se muestra el dendrograma obtenido mediante este análisis. Claramente la muestra Col 3 aparece no asociada a ningún grupo. Esto se debe a que el fragmento de 125 bp tiene un porcentaje relativo sobre el 40%. Si se realiza el análisis dándole al fragmento de 125 bp el valor promedio de las muestras de rizósfera actinorrízica, se obtiene un dendrograma que nuevamente indica que los perfiles de T-RFLP reflejan el origen de las muestras ya que se agrupan de manera similar a los dendrogramas obtenidos mediante una matriz binaria. (Figura 12B). Para validar las agrupaciones, a este dendrograma se le realizó un análisis de Montecarlo con una confianza del 90% y sobre mil iteraciones, en el cual las

agrupaciones a la derecha de la línea punteada son asociaciones que responden a un patrón definido y no pueden ser explicadas por el azar.

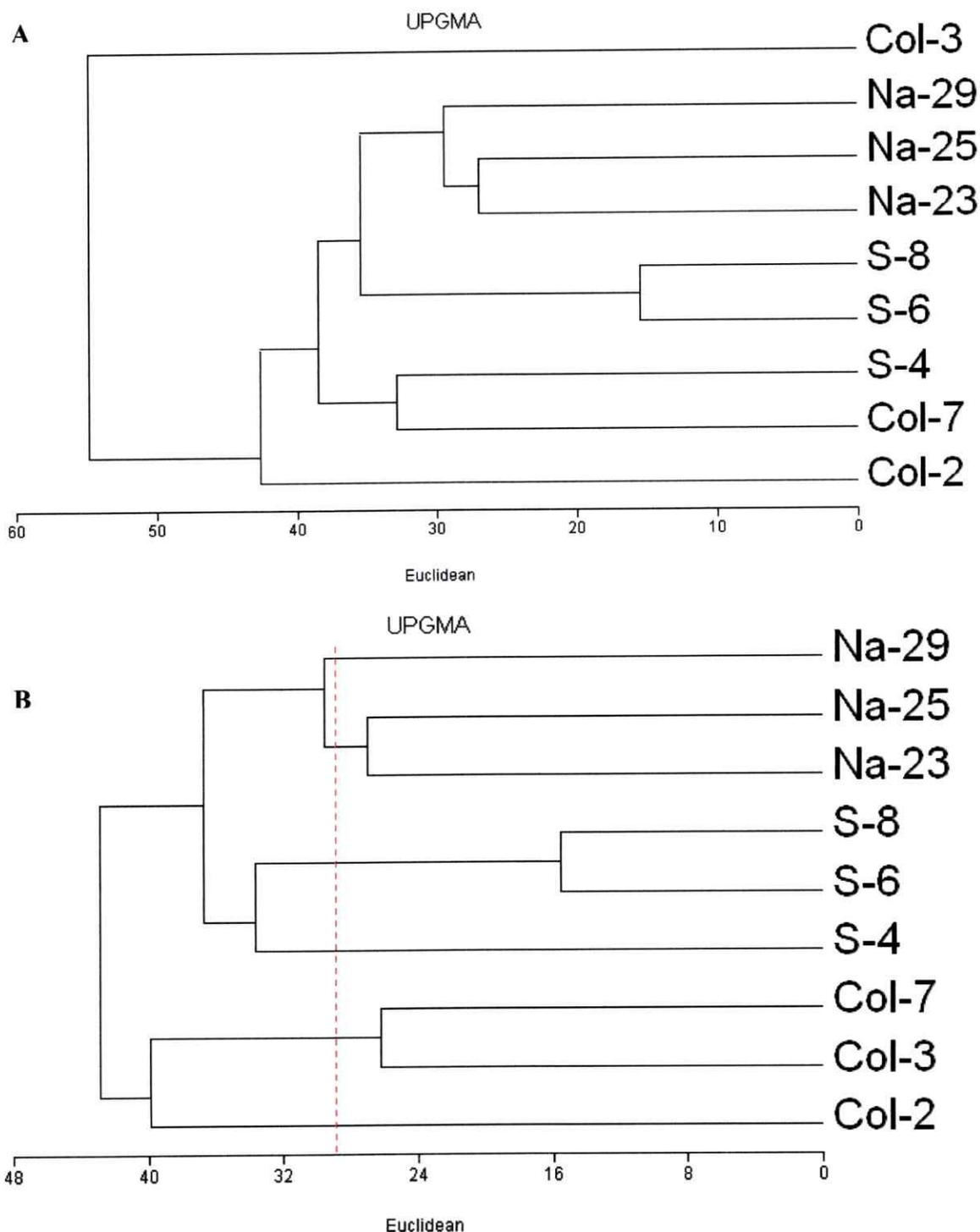


Fig 12. (A) Dendrograma euclidean de la comunidad microbiana, construido con las abundancias relativas de cada TRF obtenidas de los electroferogramas de cada muestra. (B) Se muestra el mismo análisis que en A dándole al fragmento de 125 bp de la muestra Col-3 el valor promedio de las muestras de rizósfera actinorríca.

Composición de las comunidades microbianas

La Figura 13 muestra una comparación de los TRFs más abundantes en las comunidades bacterianas estudiadas en ambas fechas de muestreo. Los datos indican que los fragmentos terminales más abundantes son comunes a casi todas las muestras, con excepción del TRF de 100bp que se encuentra sólo en suelo sin cobertura vegetal correspondiente a la muestra de Octubre.

Según los análisis realizados con el programa MICA, se identificaron posibles clases bacterianas contenidas en las muestras ambientales de este estudio. En la figura 14 se muestran gráficos de torta con las proporciones relativas de estas clases microbianas. La fracción mayor en todas las muestras corresponde a TRFs que no pudieron ser identificados por falta de información en la base de datos MICA, indicando que una parte importante de la comunidad microbiana del suelo es aún desconocida. No obstante, una importante proporción de las clases identificadas corresponden a proteobacterias, entre ellas alpha, beta y gammaproteobacterias promediando el 45% de las clases identificadas para el mes de Mayo y sobre el 20% para el mes de Octubre; en una proporción menor se encuentran las clases Firmicutes y Bacteroides promediando un 2 y 6% respectivamente.

Al comparar los meses de Mayo y Octubre se observa un porcentaje de identificación de las clases bacterianas mayor para el mes de Mayo que para Octubre, promediando el 48% y 68% de TRFs desconocidos respectivamente. Cabe destacar que en Octubre, en las muestras de suelo sin cobertura vegetal, no se pudo identificar alrededor del 90% debido principalmente a los fragmentos 100pb y 105pb, los cuales tienen un porcentaje relativo superior al 25%.

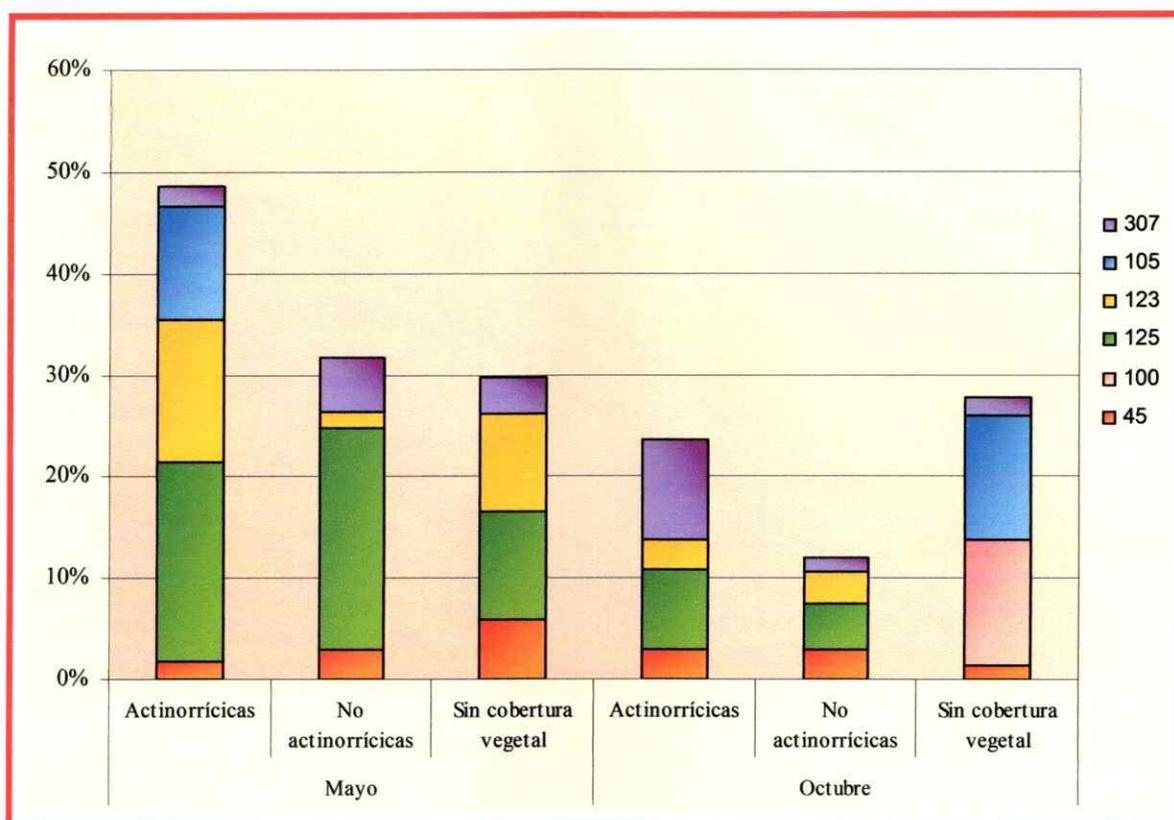


Figura 13. Frecuencia relativa de los TRFs más significativos de los electroferogramas de la comunidad total del mes de Mayo y Octubre en los tres tipos de suelos. Los fragmentos 45, 123 y 125 corresponden a Alphaproteobacteria, el fragmento 307 corresponde a Betaproteobacteria y los Fragmentos 100 y 105 no fueron identificados mediante el programa MICA.

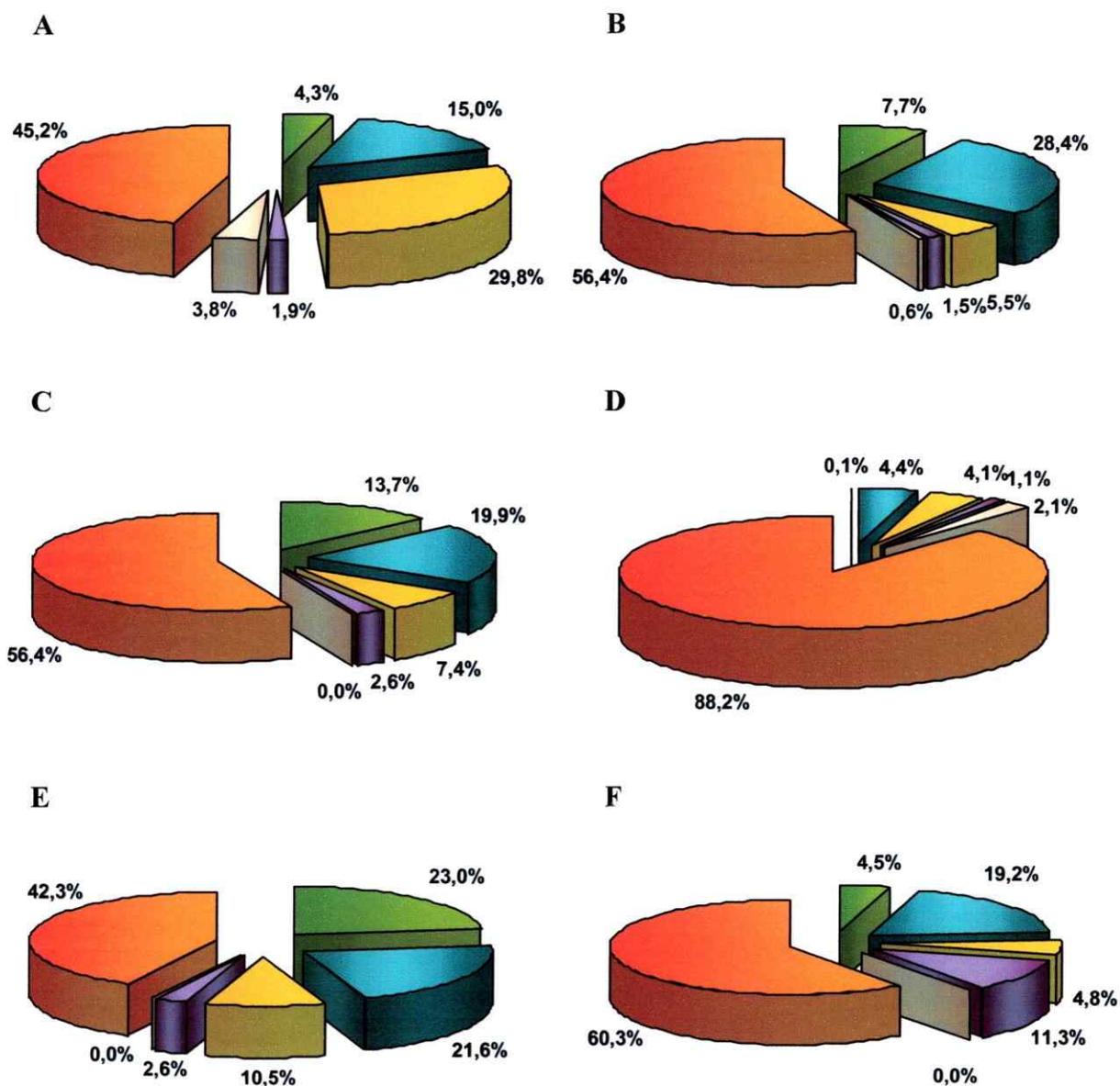


Figura 14. Porcentaje de identificación de clases microbianas mediante el programa MICA (<http://hermes.campus.udaho.edu>), para ambos meses de muestreo y en cada tipo de muestra, donde: ■ Gammaproteobacterias, ■ Alphaproteobacterias, ■ Betaproteobacterias, ■ Firmicutes, ■ Bacteroides y ■ Sin identificar en MICA. (A) rizósfera actinorríca de Mayo, (B) rizósfera actinorríca de Octubre, (C) suelo sin cobertura vegetal de Mayo, (D) suelo sin cobertura vegetal de Octubre, (E) rizósfera no actinorríca de Mayo, (F) rizósfera no actinorríca de Octubre.

Índice de Diversidad

La tabla 3 muestra los índices de Shannon obtenidos para los tres tipos de comunidades bacterianas en los dos tiempos de muestreo, es un índice que da cuenta de la diversidad de posibles filotipos en cada tipo de muestra. Se utilizó este índice por ser sensible a la riqueza y abundancia relativa de los fragmentos terminales.

En la tabla se observa en la primera columna el índice de diversidad, en la segunda columna la equitatividad, la cual se refiere a la proporción de los individuos entre las especies presentes y en la tercera columna se observan los números de fragmentos terminales de restricción, los cuales se refieren a la cantidad de peaks presentes en el electroferograma.

Al comparar las muestras derivadas de la rizósfera actinorrícica, éstas presentan leves cambios en el índice de Shannon entre un mes y otro. Sin embargo, las muestras no actinorrícicas y el suelo sin cobertura vegetal presentan diferencias más conspicuas, siendo más diversas en Octubre. Esta diferencia es consistente con la cantidad de TRFs, los cuales podrían corresponder a distintos filotipos. Las muestras de suelo sin cobertura vegetal presentan la mayor diversidad en ambos meses.

Tabla 3. Índice de diversidad de la comunidad bacteriana de Mayo y Octubre determinado de acuerdo al índice de Shannon (Log base 10) a partir del análisis de los perfiles de T-RFLP.

Muestras	Mayo			Octubre		
	Índice (H)	Equitatividad	Nº TRFs	Índice (H)	Equitatividad	Nº TRFs
Actinorrícicas	1,416	0,825	52	1,473	0,862	51
No actinorrícicas	1,311	0,798	44	1,577	0,923	51
Sin cobertura vegetal	1,548	0,902	52	1,626	0,828	92

DISCUSIÓN

Utilización del marcador 16S rDNA y del método T-RFLP para evaluar la diversidad bacteriana

Amplificación del rDNA 16S y limitaciones del PCR

Los resultados obtenidos en esta memoria indican que el marcador rDNA 16S es adecuado para proporcionar una "huella molecular" de la comunidad bacteriana total presente en muestras ambientales. El gen que codifica para el RNA 16S se encuentra en todas las bacterias cumpliendo la misma función, tiene baja tasa de transferencia horizontal y sus secuencias poseen regiones conservadas y variables las cuales son informativas a distintos niveles taxonómicos. Sin embargo, en los estudios de comunidades microbianas, cada paso en el análisis molecular está abierto a errores o sesgos como son: el tamaño de los genomas, el número de genomas y la organización del operón ribosomal (*rrn*), los cuales pueden variar ampliamente a través de las especies de procariontes. El tamaño del genoma puede abarcar un rango de 600 a 13.000 Kb, existen especies que poseen más de un genoma, el número de genes que codifican para el 16S rRNA puede variar desde 1 a 14, los cuales pueden presentar diferencias entre las secuencias duplicadas, y los operones *rrn* puede estar en cromosomas distintos (Farrelly *et al.*, 1995). Durante la realización del PCR, existe un alto riesgo de contaminación del 16S rDNA. La dificultad en la preparación del DNA genómico absolutamente libre de contaminación, acoplado con la fina sensibilidad del PCR, hace de la contaminación un problema serio, particularmente con muestras ambientales de

baja biomasa (Tanner *et al.*, 1998). Los partidores universales, por definición, son complementarios a todas las secuencias conocidas.

Para este trabajo se eligió el par de partidores fD1 y rP2 por considerarse partidores universales para la amplificación del rDNA 16S, además el partidador fD1 no amplifica DNA de cloroplastos, evitando ruido proveniente de tejido de plantas. Sin embargo ninguno de los partidores conocidos del 16S rDNA ha sido exitoso para hibridar con todas las secuencias de bacterias conocidas. Además, los productos amplificados obtenidos mediante el uso de partidores universales sólo pueden compararse con datos existentes en las bases de secuencias del 16S rDNA, lo cual podría representar sólo una porción del total de la diversidad de especies en el mundo microbiano. Por lo tanto, la elección de los partidores juega un rol fundamental en los productos amplificados que se obtendrán, ya que diversos partidores pueden sesgar a sólo una parte de la composición microbiana total (Weisburg *et al.*, 1991).

Otro factor importante son las diluciones, que podrían influir fuertemente en la composición microbiana de los productos de PCR ya que reducen el número de genomas de la muestra que sirven como molde para la amplificación (Chandler *et al.*, 1997). Por lo tanto, en las reacciones estándar de PCR puede existir una preferencia en la amplificación de ciertos filotipos, sesgando la composición microbiana resultante (Reysenbach *et al.*, 1992).

Perfiles de T-RFLP

No obstante lo descrito anteriormente, los perfiles de T-RFLP obtenidos en esta memoria y los descritos en la bibliografía muestran ser bastante estables a las

condiciones variables del PCR. Sin embargo, los datos obtenidos usando este método también deben ser cuidadosamente interpretados. Por ejemplo, las poblaciones microbianas que no son dominantes numéricamente no son representadas en los perfiles, porque los templados de DNAs de estas poblaciones representan una pequeña fracción de la comunidad total (Liu *et al.*, 1997). Consecuentemente, la diversidad de especies de la comunidad microbiana es subestimada.

Los patrones derivados de una simple enzima de restricción no resultan tener una exacta caracterización de la comunidad, por lo que el uso de varias combinaciones de simples enzimas de digestión es la mejor estrategia para la inferencia filogenética y los perfiles de comunidades bacterianas (Liu *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998; Dunbar *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 2000; Blackwood *et al.*, 2003; Conn & Franco, 2004) En este estudio se utilizó sólo la endonucleasa *HaeIII*, pero las muestras se amplificaron independientemente con los partidores fD1 y rP2 marcados, mejorando la resolución de los perfiles de T-RFLP para caracterizar cada muestra ambiental ya que se consideraron los fragmentos de restricción terminales de ambos extremos del gen ribosomal.

Al comparar los TRFs de los resultados obtenidos y los predecibles por el programa MICA, cada fragmento individual podría representar un filotipo, sin embargo el rango de los organismos representados por todos los TRFs podría ser bastante más amplio, ya que algunos de los TRFs podrían representar a más de un organismo. Además, se debe considerar que los tamaños de los TRFs pueden tener un ± 1 pb, por lo cual algunos autores recomiendan tomar un rango de tamaño para los TRFs (Dunbar *et al.*, 2001)

En el proceso de estandarización de los datos, los TRFs con baja fluorescencia son eliminados del análisis ya que generalmente ellos representan la fluorescencia *background* de la técnica. El análisis se realiza con los TRFs con alta fluorescencia ya que éstos son los TRFs reproducibles. No obstante, la estandarización podría eliminar TRFs reales que se encuentran poco representados en la muestra, ya que ellos se encuentran en el límite de discriminación del método (Dunbar *et al.*, 1999).

Sin embargo, los perfiles de T-RFLP entregan un patrón adecuado para caracterizar la diversidad genética de las comunidades bacterianas de muestras ambientales. A través de estos perfiles moleculares es posible comparar estas comunidades microbianas y/o detectar cambios en su estructura que ocurren a escala espacial y temporal o en respuesta a perturbaciones ambientales.

Efecto de la rizósfera sobre la diversidad de la comunidad bacteriana

La rizósfera de las plantas es un ambiente dinámico en el cual muchos factores pueden afectar la estructura y composición de la comunidad microbiana que coloniza las raíces. Esta diversidad de microorganismos en la rizósfera difiere a través de las distintas especies de plantas debido a las diferencias en los exudados de la raíz en cada una de ellas (Fang *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en esta memoria indican que las muestras ensayadas poseen una comunidad bacteriana propia, lo que estaría indicando que las raíces de las plantas, tanto *Colletia hystrix* como las no actinorrícicas, pueden influenciar a las comunidades microbianas del suelo. Este efecto podría ocurrir por varios mecanismos, entre los que se han descrito la excreción de componentes orgánicos específicos, competencia por nutrientes, además que las raíces proporcionan una

superficie sólida para la adherencia de los microorganismos. La naturaleza de estas influencias es altamente variable y depende de la cantidad y de la composición de los materiales orgánicos liberados por las plantas, puesto que estos exudados influyen selectivamente el crecimiento de bacterias y hongos que colonizan la rizósfera, alterando la química del suelo en la vecindad de sus raíces (Yang & Crowley, 2000).

Los perfiles de T-RFLP de la comunidad bacteriana también podrían responder a cambios en patrones de exudados que pueden resultar de una variedad de estímulos ambientales como temperatura, estrés, agua, pH, limitación de nutrientes y perturbaciones químicas (Fang *et al.*, 2001). Ya que los productos liberados por las raíces pueden ser altamente específicos para una especie de planta dada o incluso un cultivo en particular (Duineveld *et al.*, 2001), éstas enriquecen selectivamente sus rizósferas con microorganismos que se adaptan en la utilización de los compuestos orgánicos específicos que se liberan. Puesto que la producción de exudados liberados por la raíz puede variar durante el desarrollo de la planta, también es probable que las comunidades microbianas de la rizósfera puedan ser influenciadas por la etapa y la edad de desarrollo de la planta. Esto puede resultar en una acumulación de una microflora específica para una planta en particular y su genotipo (Duineveld *et al.*, 1998).

Factores edáficos

De todos los parámetros edáficos analizados, sólo el pH y el potasio mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras provenientes de ambos meses ($p \leq 0.05$). En el análisis de correspondencia canónica se observó una fuerte influencia del pH sobre el agrupamiento de las muestras de rizósfera, separándolas

claramente de las de suelo sin cobertura vegetal. Asimismo, el nitrógeno y el fósforo, aunque en menor grado, influyen sobre el agrupamiento de estas muestras.

Numerosos antecedentes en la bibliografía indican que el crecimiento, la supervivencia y la actividad metabólica de los microorganismos están sometidos a influencias de numerosos factores abióticos. En algunos casos, es posible identificar uno o más factores que regulan el crecimiento y las actividades microbianas en un hábitat dado. El efecto de un factor edáfico sobre una población microbiana suele depender a su vez de otros factores abióticos. Por ejemplo, un factor edáfico importante es el pH, de cuyos valores dependen la supervivencia y el suministro de nutrientes; la disponibilidad de agua líquida y la textura del suelo, puesto que determina la habilidad del suelo para retener agua y nutrientes. Otros factores importantes incluidos en este estudio son el nitrógeno, el cual puede estar presente en el suelo como amonio, nitrito o nitrato y el fósforo, éste último necesario para la generación microbiana de ATP; y compuestos orgánicos que suelen ser el factor limitante para el crecimiento de los microorganismos heterótrofos.

Diversidad de la Comunidad bacteriana total

Los resultados presentados en esta memoria muestran que la estructura de las comunidades bacterianas caracterizada por su patrón de T-RFLP se agrupan de acuerdo a su origen. Tanto estudios teóricos como empíricos sugieren que en comunidades de plantas, animales y microorganismos, la interacción competitiva es la clave determinante de la abundancia de especies y diversidad (Zhou *et al.*, 2002). Por ejemplo, en sitios

ricos en carbono orgánico, las comunidades microbianas exhiben un patrón de distribución uniforme, al contrario de suelos con bajo contenido de carbono.

En la rizósfera, al comparar los perfiles de T-RFLP del mes de Mayo se observa una dominancia de ciertos TRFs. Una posible explicación puede ser la disminución en la disponibilidad de sustrato, por lo que existe una mayor competencia, donde las especies mejor adaptadas a las condiciones dominan reduciendo la sobrevivencia y con ello la riqueza de la comunidad.

Por el contrario, el mes de Octubre presenta una distribución más homogénea de los posibles filotipos. Esta falta de dominancia de TRFs observada en superficies de suelo es altamente inusual en comunidades ecológicas, ya que implica una falta de competencia, causada posiblemente por: (i) superabundancia de recursos (ii) heterogeneidad de recursos, es decir si los recursos están disponibles en muchas formas diferentes, las poblaciones evitarán la competencia por especialización, (iii) aislamiento espacial: si el hábitat está subdividido en muchos "minihabitats" separados de recursos, las poblaciones pueden evitar la competencia por aislamiento físico y (iv) muchas poblaciones pueden mantenerse bajo un medio ambiente de condiciones fluctuantes (Zhou *et al.*, 2002).

Para las muestras sin cobertura vegetal, el incremento en la diversidad parece estar relacionado con la declinación de ciertos TRFs, en las muestras de la rizósfera de invierno a verano (Lipson & Schmidt, 2004). Además, este tipo de suelos podrían tener un mayor aislamiento espacial con respecto a las muestras de rizósfera, lo que podría explicar la alta diversidad obtenida mediante el Índice de diversidad de Shannon en ambos meses. El aislamiento reduce la posibilidad de colonización por cualquier

organismo extraño, dificultando a cualquier invasor que intente dominar, lo cual favorece el desarrollo de genotipos endémicos en el área (Torsvik & Øvreås, 2002).

Otra posible explicación de esta diversidad puede partir desde la extracción de DNA, puesto que siempre resulta en coextracción de sustancias húmicas las cuales se encuentran en mayor abundancia en la rizósfera, puesto que vienen de la degradación de materia orgánica, principalmente de la lignina (Kordel *et al.*, 1997). Estos compuestos interfieren en la detección y medición del DNA, pueden inhibir la *Taq* DNA polimerasa en el PCR, interferir en la digestión de las endonucleasas y reducir la eficiencia y la especificidad de la hibridación del DNA, ya que compiten con los ácidos nucleicos (Zhou *et al.*, 1996). Por lo tanto, el número de amplicones en la rizósfera puede dar un resultado sesgado, privilegiando aquellos filotipos que se encuentren más abundantes en la comunidad y fuera de la rizósfera.

Los perfiles de T-RFLP también fueron analizados mediante el programa MICA para detectar posibles filotipos en las muestras e inferir una posible composición de la comunidad. Considerando que la asociación de los TRFs con determinado filotipo no es inequívoca, se consideró adecuado caracterizar la composición en términos de los principales linajes bacterianos. Los datos revelan que el grupo mejor representado son las Proteobacterias y concuerdan con trabajos previos donde encontraron que un 50% de los clones pertenecen a Proteobacterias, un 13% a bacterias gram-positivas y un 7% a *Acidobacterium* (McCaig *et al.*, 1999). Datos similares de Borneman *et al.* (1996) detectaron un 16% de Proteobacterias en suelos de prados relativamente oligotróficos. Finalmente estudios realizados por Smit *et al.* (2001), encontraron que aproximadamente el 35% de los clones pertenecen a la clase Proteobacteria.

CONCLUSIONES

1. Las comunidades bacterianas de la rizósfera y suelo sin cobertura vegetal se agrupan de acuerdo a su origen.
2. El método de T-RFLP resulta ser adecuado y reproducible para comparar diversidad en la comunidad bacteriana en muestras ambientales.
3. La comunidad bacteriana total muestra una riqueza similar de fragmentos terminales de restricción para ambos meses, no obstante se aprecia una diferencia en su abundancia relativa.
4. El Nitrógeno es el parámetro ambiental con mayor influencia en la asociación de las muestras de rizósfera actinorrífica en ambos meses.
5. La mayor diversidad de las muestras se presenta en el suelo sin cobertura vegetal.
6. Existe una dominancia de Proteobacterias en las muestras de suelo y rizósfera.

BIBLIOGRAFÍA

- Amman, R.; Ludwig, W. and K. Schleifer.** 1995. Phylogenetic Identification and *In Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 754–762.
- Benoit, L. F. & A. M. Berry.** 1990. Methods for Production and Use of Actinorhizal Plants in Forestry, Low Maintenance Landscape and Revegetation, The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Academic Press Inc. 1-13.
- Blackwood, C.; Marsh, T.; Sang-Hoon, K. and P. Eldor.** 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 926-932.
- Borneman, J.; Skroch, P. W.; O'Sullivan, K. M.; Palus, J. A.; Rumjanek, N. G.; Jansen, J. L.; Nienhuis, J. and E. W. Triplett.** 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. and Environ. Microbiol.* **62**: 1935-1943.
- Chandler, D. P.; Fredrickson, J. K. and F. J. Brockman.** 1997. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.* **6**: 475–482.
- Clement, B.G, Kehl LE, DeBord KL, and Kitts CL.** 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Meth.* **31**: 135–142.
- Conn, V. M. and C. M. M. Franco.** 2004. Effect of Microbial Inoculants on the Indigenous Actinobacterial Endophyte Population in the Roots of Wheat as Determined by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6407-6413.
- Duineveld, B.; Kowalchuk, G.; Keijzer, A.; Van Elsas, J. and J. Van Veen.** 2001. Analysis of the Dynamics of Bacterial Communities in the Rhizosphere of the *Chrysanthemum* via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA as Well as DNA Fragment Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 172-178.
- Duineveld, B.; Rosado, A.; Van Elsas, J. and J. Van Veen.** 1998. Analysis of the Dynamics of Bacterial Communities in the Rhizosphere of the *Chrysanthemum* via

- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Substrate Utilization Patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4950-4957.
- Dunbar, J., L. O. Ticknor. and C. R. Kuske.** 2000. Assessment of microbial diversity in two southwestern U.S. soils by terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2943-2950.
- Dunbar, J.; Takala, S.; Barns, S. M.; Davis, J. A. and C. R. Kuske.** 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1662-1669.
- Dunbar, J.; Ticknor, L. O. and C. R. Kuske.** 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **67**: 190-197.
- Fang, C.; Radosevich, M. and J. Fuhrmann.** 2001. Characterization of Rhizosphere Microbial Community Structure in Five Similar Grass Species Using FAME and BIOLOG analyses. *Soil Biol. Bioch.* **33**: 679-682.
- Fang, M.; Kremer, R. J.; Motavalli, P. P. and G. Davis.** 2005. Bacterial Diversity in Rhizosphere of Nontransgenic and Transgenic Corn. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4132-4136.
- Farrelly, V.; Rainey, F. A. and E. Stackebrandt.** 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2798-2801.
- Fredlund, L.; Ekulend, F.; Jacobsen, C. S. and J. Kaare.** 2001. Development and Application of a Most-Probable-Number-PCR Assay to Quantify flagellate populations in Soil samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1613-1618.
- Hawksworth, D. L.** 1996. Microorganisms: the neglected rivets in ecosystems maintenance. En: Biodiversity, science and development: towards a new partnership. F. Castri & T. Younes, eds. CAB International. Wallingford.
- Kennedy, A. and K. Smith.** 1995. Soil diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil.* **170**: 75-86.

- Kennedy, A. and V. Gewin.** 1997. Characterization of microbial communities in agroecosystems. En: Microbial communities, functional versus structural approaches. H. Insam & A. Rangger, eds. Springer. Germany.
- Kopczynski, E. D.; Bateson, M. M. and D. M. Ward.** 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 746–748.
- Kordel, W.; Dassenakis, M.; Lintlemann, J. and S. Padberg.** 1997. The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils. *PAC.* **69**: 1571-1600.
- Kuske, C. R.; Ticknor, L. O.; Miller, M. E.; Dunbar, J. M.; Davis, J. A.; Barns, S. M. & J. Belnap.** 2002. Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in Arid Grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1854-1863.
- Lamar, R. T. and D. M. Dietrich.** 1990. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3093-3100.
- Lipson D. A. and S. K. Schmidt** 2004. Seasonal Changes in an Alpine Soil Bacterial Community in the Colorado Rocky Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5780-5790.
- Liu, W. T.; Marshi, T. L.; Cheng H. and L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.
- Ludemann, H. Arth, I. and W. Liesack.** 2000., Spatial Changes in the Bacterial Community Structure along a Vertical Oxygen Gradient in Flooded Paddy Soil Cores. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 754-762.
- Mahaffee, W.F. & J.W. Kloepper.** 1996. Temporal Changes in the Bacterial Communities of Soil, Rhizosphere, and Endorhiza Associated with Field-Grown Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.* **34**: 210–223.

- Marsh, L. T.** 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 323-327
- Marsh, T. L.; Saxman, P.; Cole, J. and J. Tiedje.** 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3616-3620.
- McCaig, A. E.; Glover, L. A. and J. I. Prosser.** 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1721-1730.
- Muyzer, G.; Hottenträger, S.; Teske, A., and Wawer, C.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: *Molecular Microbial Ecology Manual 3.4.4.* A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, and F.J. de Bruijn, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 1-23
- Kovach, W.L.** 2001 MSVP versión 3.12d,; Kovach Computing Services, Wales, UK.
- Osborn A. M.; Moore E. and K. N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**: 39-50
- Ovreas, L.** 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* **3**: 236-251.
- Picard, C.; Ponsonnet, C.; Paget, E.; Nesme, X. and P. Simonet.** 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2.717-2.722.
- Reysenbach, A. L.; Giver, L. J.; Wickham, G. S. and N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3417-3418.
- Roose-Amsaleg, E.; Garnier-Sillam, M.** 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples, *Appl. Soil Ecol.* **18**: 47-60
- Schlöter, M.; Leubhn, M.; Heulin T. and A. Hartmann.** 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 647-660.

- Smit, E.; Leeftang, P.; Gommans, S.; van den Broek, J.; van Mil, S. and K. Wernars.** 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2284-2291.
- Tanner, M.; Goebel, B. M.; Dojka, M. A. and N. R. Pace.** 1998. Specific rDNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3110-3113
- Ter Braak, C. J. F.** 1985. Correspondence Analysis of incident and abundant data: properties in terms of a unimodal response model. *Biometrics.* **41**: 859-873.
- Ter Braak, C. J. F.** 1986. Canonical Correspondence Analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**: 1167-1179.
- Torsvik, V. & L. Øvreås.** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 240-245.
- Van de Peer, Y. & R. De Wachter.** 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environments. *Comput. Applic. Biosci.* **10**: 569-570.
- Ward, B. B.** 2002. How many species of prokaryotes are there? Geosciences Department, Princeton University, Princeton, NJ 08544.
- Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A. and D. J. Lane.** 1991 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Wu, L. D. K. Thompson, G. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje and J. Zhou.** 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5780-5790.
- Yang, C.; and D. E. Crowley.** 2000. Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 345-351.
- Zak, J. C.; Willig M. R.; Moorhead D. and H. Wildman.** 1994. Functional diversity of microbial communities a quantitative approach. *Soil Biol. & Biochem.* **26**: 1101-1108.

- Zhou, J.; Beicheng, X.; Treves, D. S.; Wu, L. Y.; Marsh, T. L.; O'Neill, R. V.; Palumbo, A. V. and J. M. Tiedje.** 2002. Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial diversity in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 326-334.
- Zhou, J.; Bruns, M. A. and J. M. Tiedje.** 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.