

Capítulo 4

Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos

Chapter 4

Microbiome studies in the biological control of plant pathogens

Alejandro Caro-Quintero,¹ Carolina González,¹
Alicia Balbín-Suárez,² Michael Wisniewski,³ Gabriele Berg,⁴
Kornelia Smalla,² Alba Marina Cotes¹

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

² Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Institute for Cultivated Plants

³ U. S. Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS)

⁴ Institute for Environmental Biotechnology, Graz University of Technology

Contenido

Introducción	260
Contexto histórico: del microbioma humano al microbioma de plantas y su aplicación en la agricultura	261
¿Por qué estudiar el microbioma?	264
Los fitobiomas, una nueva alternativa para la agricultura	265
Especificidad del microbioma en los distintos tejidos	265
El microbioma en el control biológico	267
¿Qué son los fitobiomas?	268
¿Qué se conoce de los fitobiomas?.....	270
¿Cómo es la comunicación en el fitobioma?.....	270
Estudios de caso.....	271
La composición espacial de la comunidad fúngica asociada a la manzana: una herramienta para el diseño de nuevas estrategias de control de enfermedades.....	271
Biocontroladores vs. patógenos humanos y vegetales en estudios del microbioma	274
El complejo biocontrol de <i>Ralstonia solanacearum</i> , patógeno de solanáceas	276
Suelos supresivos como una fuente de microorganismos para el control de <i>Fusarium oxysporum</i> en uchuva	281
Conclusiones y perspectivas	284
Agradecimientos	285
Referencias	286

Resumen

A pesar de que el control biológico de fitopatógenos ha sido una alternativa exitosa que ha permitido seleccionar microorganismos para la generación de bioproductos y entender múltiples mecanismos biológicos, ya no puede considerarse como una estrategia definida solamente a partir de la selección de una gama de microorganismos cultivables ni entenderse como una serie de interacciones en una sola dirección: planta-patógeno o planta-patógeno-agente controlador. Gracias al desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva y de las ciencias ómicas, se ha logrado tener en cuenta el resto de la comunidad microbiana (hoy llamada *microbioma*), mediante el estudio independiente del cultivo de las comunidades establecidas en los distintos tejidos, sus genes y sus interacciones. A partir del conocimiento del microbioma de las plantas se han logrado identificar los microorganismos que están presentes en los diferentes tejidos, cuáles son sus posibles funciones, cómo expresan estas funciones frente a distintas condiciones ambientales y cuál es su posible rol en la salud de las plantas, la salud humana y la producción agrícola. Con base en esto, y dada la relevancia actual del microbioma, en este capítulo se repasa brevemente su estudio, desde sus orígenes hasta su aplicación en el control biológico de patógenos de plantas y en el desarrollo de nuevas estrategias de manejo de enfermedades limitantes en cultivos de importancia económica.

Palabras clave

Control biológico, fitobioma, microbioma, supresividad

Abstract

Biological control of plant pathogens, although it has been a successful alternative that has allowed to select microorganisms for the generation of bioproducts and to understand multiple biological mechanisms, cannot be considered as a strategy defined only from the selection of a range of cultivable microorganisms, nor understood from interactions in a single direction: plant-pathogen or plant-pathogen-control agent. Thanks to the development of mass sequencing technologies and the omics sciences, it has been possible to take into account the rest of the microbial community from the study of the independent culture of the established communities in different tissues, their genes and their interactions, today known as microbiome. The knowledge of the microbiome of plants has been able to elucidate which microorganisms are present in the different tissues, what are their possible functions, how they express these functions against different environmental conditions and what their possible role in plant health, human health and agricultural production. Based on this context and given the current relevance of the microbiome, in this chapter we will highlight the importance of studying the microbiome from its origins, to its application both in the biological control of plant pathogens, and in the development of new management strategies.

Keywords

Biocontrol, microbiome, phytobiome, suppressiveness

Introducción

Los microorganismos son fundamentales para la vida en la Tierra, pero poco conocemos sobre su función ecológica (Gilbert et al., 2010; Turnbaugh et al., 2007). Una evidencia molecular sugiere que las asociaciones entre hongos formadores de micorrizas arbusculares y algas verdes fueron fundamentales para la evolución de las plantas: los análisis de secuencias de proteínas indican que las algas verdes y los principales linajes de hongos estaban presentes hace 1.000 millones de años, mientras que las plantas terrestres aparecieron hace 700 millones. Esto probablemente afectó la atmósfera del planeta y, en consecuencia, el clima y la evolución de los animales en el Precámbrico (Heckman et al., 2001).

La importancia de las comunidades microbianas para las plantas fue demostrada en 1904, cuando Lorenz Hiltner definió el término rizosfera y desarrolló sus investigaciones sobre el crecimiento vegetal y la protección contra patógenos, con la hipótesis de que la resistencia de las plantas a los patógenos dependía de la composición de la microflora presente en la rizosfera (Hartmann, Rothballer, & Schmid, 2008). Así mismo, se ha determinado el rol de los microorganismos asociados a las plantas como actores fundamentales de los ciclos biogeoquímicos globales (Philippot, Hallin, Börjesson, & Baggs, 2009).

Las plantas presentan una gran diversidad de microorganismos asociados, tanto en su superficie (ectosfera) como en su interior (endosfera). Muchos de estos microorganismos son realmente benéficos y determinan el desarrollo y el estado fisiológico de estas, ya que mejoran la captura de nutrientes y aumentan su disponibilidad, producen compuestos que estimulan el crecimiento de las plantas (hormonas, aminoácidos y vitaminas), promueven la biodiversidad, activan los mecanismos de defensa contra fitopatógenos —vía *quorum sensing* (AHLs) o vía resistencia sistémica inducida (ISR)— y les confieren resistencia a las plantas frente al estrés biótico y abiótico (Berg & Smalla, 2009; Bulgarelli, Schlaeppi, Spaepen, Ver Loren van Themaat, & Schulze-Lefert, 2013; De Carvalho et al., 2016; Lugtenberg & Kamilova, 2009;

Mendes et al., 2015; Vandenkoornhuyse, Quaiser, Duhamel, Le Van, & Dufresne, 2015).

De este modo, las plantas y su microbiota asociada pueden ser consideradas como una sola entidad, es decir, como un *holobionte*, término acuñado por Lynn Margulis en 1991 (Mann, 1991), e incluso referido por Charles Darwin en su libro *The Variation of Plants and Animals Under Domestication* (1868, p. 204) (Darwin, 2010). Los holobiontes son entidades compuestas por el hospedero y por todos sus microorganismos simbióticos, entre ellos, a) los que afectan el fenotipo del holobionte y han coevolucionado con el hospedero, b) los que afectan el fenotipo del holobionte, pero no han coevolucionado con el hospedero y c) aquellos que no afectan en absoluto el fenotipo del holobionte (Theis et al., 2016).

Los microorganismos del ambiente no forman parte del holobionte y son analizables metagenómicamente. Los microorganismos se pueden transmitir horizontal o verticalmente y pueden ser residentes permanentes o solo visitantes del hospedero. Por esta razón, los fenotipos del holobionte pueden cambiar en el tiempo y en el espacio en la medida en que los microorganismos entren y salgan de este. En consecuencia, la aptitud de la planta no debe ser definida solamente por ella en cuanto individuo, sino también por la microbiota que la acompaña (Vandenkoornhuyse et al., 2015).

Dada la complejidad de esta simbiosis no solo se ha ampliado la definición de holobionte, sino que, a su vez, se han creado terminologías que constituyen un vocabulario y un marco más amplio para referirse a la biología del hospedero a la luz del microbioma. Un ejemplo de ello es el término *hologenoma*, que hace referencia a los genomas del huésped y a los de todos sus microorganismos en cualquier momento dado, con sus genomas y genes individuales que ejercen las mismas tres formas de interacción hospedero-simbionte mencionadas anteriormente (Theis et al., 2016).

En el pasado, el estudio de las comunidades microbianas dependió del aislamiento y cultivo de los microorganismos allí presentes, forma en la

cual se definió su función y estructura filogenética. Recientemente, solo gracias a los avances en metagenómica, ha empezado a ser estudiado el rol de la comunidad microbiana total (microorganismos cultivables y no cultivables) y sus interacciones. *Microbioma* significa pequeño bioma o ecosistema que comprende todos los microorganismos presentes en un medio determinado, sus genes y las interacciones medioambientales.

Si consideramos que cada planta se puede dividir en diferentes microambientes, por ejemplo, la rizosfera (raíz), la filosfera (hoja), la antosfera (flor), la espermosfera (semillas) y la carposfera (fruta), y que dentro de estos se pueden diferenciar los tejidos internos y la superficie exterior, habría muchos microambientes inexplorados. Todos estos proporcionan las condiciones bióticas y abióticas específicas para la vida microbiana, la cual, a su vez, tiene una función específica en relación con la planta hospedera.

El microbioma vegetal se ha considerado como uno de los factores determinantes en la salud y productividad de las plantas (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012; Bulgarelli et al., 2013; Lebeis, Rott, Dangl, & Schulze-Lefert, 2012). Se ha demostrado el potencial de la manipulación del

microbioma para estimular la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y la resistencia a condiciones de estrés (Berg, Rybakova, Grube, & Köberl, 2016). También se han obtenido efectos positivos en la salud de las plantas, particularmente, en el control biológico de enfermedades (Berendsen et al., 2012; Berg, 2009; Berg, Zachow, Müller, Philipps, & Tilcher, 2013; Leveau, 2007; Mendes, Kuramae, Navarrete, Van Veen, & Tsai, 2014; Mendes et al., 2011). Esto ha llevado a la reducción de los insumos químicos (Adesemoye, Torbert, & Kloepper, 2009) y ha permitido estudiar el impacto y el riesgo de la aplicación de los inóculos microbianos (Scherwinski, Grosch, & Berg, 2008).

Así mismo, se han demostrado efectos positivos en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (Singh, Bardgett, Smith, & Reay, 2010) y se ha logrado aumentar la producción agrícola (Bakker, Manter, Sheflin, Weir, & Vivanco, 2012). Sin embargo, es necesario desarrollar más estudios prácticos, que resultan clave para entender la organización y la función de la comunidad microbiana total en las plantas y, así, ampliar la visión sobre su función y utilización para mejorar la producción agrícola. En este capítulo mostraremos la relevancia de los estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de patógenos de plantas.

Contexto histórico: del microbioma humano al microbioma de plantas y su aplicación en la agricultura

Con el fin de construir el mapa genético de todos los microorganismos que habitan el cuerpo humano, en 2007 un consorcio de investigadores de más de 80 centros de investigación de Estados Unidos, liderados por el Instituto Nacional de Salud de este país (NIH, por su sigla en inglés), iniciaron el Proyecto del Microbioma Humano (HMP, por su sigla en inglés). Este proyecto permitió estudiar, durante cinco años, las comunidades microbianas que viven en y sobre nuestros cuerpos, gracias al aprovechamiento del desarrollo alcanzado y de los bajos costos de las técnicas de secuenciación de genes, así como del uso de aproximaciones de metagenómica.

Como resultado de este trabajo, se obtuvo un catálogo del material genético de bacterias, virus y otros microorganismos tomados de distintas partes del cuerpo de hombres y mujeres (e incluso de materia fecal, para estudiar los microorganismos del tracto digestivo). Todos estos resultados se encuentran publicados en una serie de artículos en *Nature* y en revistas de la Biblioteca Pública de Ciencia (PLoS, por su sigla en inglés) (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Además del catálogo, este proyecto contribuyó a la definición de las funciones de estas comunidades microbianas en la salud humana y en la enfermedad (Human Microbiome Project

Consortium, 2012), lo cual no solo proporcionó un marco de referencia para nuevos estudios e investigaciones en humanos, sino que orientó el estudio de microbiomas en plantas (Turner, James, & Poole, 2013), con su consecuente enfoque en la agricultura (Berg et al., 2013; Berg, Grube, Schlöter, & Smalla, 2014c; Busby et al., 2017).

Para comprender el estudio del microbioma de plantas y sus aplicaciones en la agricultura, es necesario hablar del microbioma humano. De acuerdo con el estudio realizado por Sender, Fuchs y Milo (2016), basado en el llamado "hombre de referencia" (varón teórico de entre 20 y 30 años, con un peso de 70 kilogramos y 170 centímetros de altura), todo ser humano presenta 38 billones de bacterias, la mayor parte de las cuales se encuentran localizadas en el colon; mientras que el cuerpo humano está conformado por 30 billones de células aproximadamente, lo cual evidencia una proporción de 1,3:1. El peso de los 38 billones de bacterias ($3,8 \times 10^{13}$), así como el peso de células contribuyen a los 70 kilogramos de la persona de referencia, de los cuales los 30 billones de células (3×10^{13}) pesan 47 kilogramos, el 25 % procede del líquido extracelular y otro 7 % son sólidos extracelulares. El 75 % de esta masa se debe a solo dos tipos de células: los adipocitos que forman la grasa y las células musculares (Sender et al., 2016). En las mujeres, la proporción de bacterias frente a células humanas se incrementa un tercio con respecto a la de los hombres (Sender et al., 2016). Estos microorganismos en general no son perjudiciales, por el contrario, son esenciales para mantener la salud (Sender et al., 2016).

La composición del microbioma tiende a estar definida por el sitio del cuerpo, el cual genera diferentes presiones de selección (Human Microbiome Project Consortium, 2012). El microbioma puede iniciarse desde el nacimiento (Palmer, Bik, DiGiulio, Relman, & Brown, 2007) e incluso estar influenciado por la microbiota procedente de la vagina (Ravel et al., 2011) o de la piel de la madre, según la vía de nacimiento (Dominguez-Bello et al., 2010). La acumulación de otros organismos continúa durante la infancia y la niñez, como se ha demostrado con estudios del intestino (Yatsunen et al., 2012) y del tracto respiratorio (Cardenas et al., 2012). Estos estudios, así como las diferentes iniciativas derivadas

del HMP, buscan incrementar la comprensión de la relación entre la composición del microbioma y la salud humana, lo cual incluye las respuestas a los medicamentos (Haiser et al., 2013), la susceptibilidad a infecciones, a enfermedades crónicas (Tang et al., 2013) y al empleo de neuroquímicos y su influencia en el comportamiento humano (Lyte, 2013).

Con respecto a las plantas, sus microbiomas también contienen diverso acervo genético y funcional, compuesto por virus, procariontes y eucariotes, los cuales están asociados con varios hábitats en una planta hospedera. Estos microbiomas varían en todo sentido: de un organismo a otro (plantas individuales), de un órgano específico a otro (raíces, hojas, brotes, flores, semillas, etc.), y de una zona de interacción (entre las raíces, por ejemplo) a otra (los alrededores del suelo, como la rizosfera) (Rout & Southworth, 2013). Además, los microbiomas están en relación directa con el desarrollo y la salud de la planta, ya que favorecen la absorción y disponibilidad de nutrientes necesarios para el crecimiento vegetal (Elser et al., 2007; Friesen et al., 2011; Ortiz, Armada, Duque, Roldán, & Azcón, 2015), la fenología (Wagner et al., 2014) y también pueden defender de manera muy eficaz a su hospedero del ataque de organismos patógenos (Busby, Peay, & Newcombe, 2016; Mendes et al., 2011; Santhanam et al., 2015; Selosse, Bessis, & Pozo, 2014).

Es así como hay una gran analogía funcional entre nuestro sistema digestivo y la raíz de una planta. Ambos son ecosistemas eucariotes esenciales para la absorción de nutrientes por parte del organismo que los posee y que alberga un conjunto de microorganismos con una relación de simbiosis tanto mutualista como comensal (Bernal, 2016). De hecho, por la gran cantidad y variedad de microorganismos en la rizosfera, esta podría considerarse como un segundo genoma de la planta.

Diversos estudios en las últimas décadas han demostrado que el estudio de las interacciones planta-microorganismos y humano-microorganismos no solo son cruciales para una mejor comprensión del desarrollo vegetal y animal, sino también para la producción agropecuaria sostenible y para la salud humana, respectivamente. Igualmente, la interacción del microbioma de la planta y del microbioma

humano está estrechamente relacionada, ya que el de las plantas, además de influenciar positiva o negativamente el rendimiento de estas, puede afectar la salud humana: la puede mejorar (Blaser, Bork, Fraser, Knight, & Wang, 2013) o la puede afectar con brotes de enfermedades infecciosas por la transferencia de posibles patógenos (Van Overbeek et al., 2014).

Aunque los microorganismos de la rizosfera han sido estudiados en relación con la presencia de fitopatógenos y de microorganismos benéficos para las plantas, se les ha prestado menor atención a los patógenos humanos que se encuentran en la rizosfera. Al respecto, algunos reportes describen la proliferación de bacterias patógenas humanas en los tejidos vegetales (Tyler & Triplett, 2008). Tal es el caso de los estudios realizados por Kaestli et al. (2012), quienes reportan que *Burkholderia pseudomallei*, causante del muermo o melioidosis de equinos y de humanos —enfermedad endémica del Sudeste Asiático y Australia, y presente también en Brasil— se alberga en tejidos de gramíneas.

Teplitski, Warriner, Bartz y Schneider (2011) reportan que algunos fitopatógenos facilitan el ingreso de patógenos humanos a las plantas, mientras que algunas bacterias asociadas con el biocontrol de enfermedades producen antibióticos o compiten por nutrientes, de forma tal que inhiben la adherencia y colonización de los tejidos vegetales por patógenos humanos tales como *Salmonella* y formas virulentas de *Escherichia coli*. Las interacciones y ciclos de vida de los patógenos humanos en las plantas (Barak & Schroeder, 2012), así como los mecanismos moleculares y las circunstancias ecológicas que conducen a saltos en el rango de existencia de hospederos (Van Baarlen, Van Belkum, Summerbell, Crous, & Thomma, 2007), confirman que la visión de un microorganismo limitada a un solo sistema, sea vegetal o animal, ha impedido considerar la naturaleza de este en términos de la gama completa de sus posibles interacciones (Holden, Pritchard, & Toth, 2009).

El potencial hologenómico del microbioma asociado a la planta representa un inmenso reservorio sin explotar, que puede mejorar las funciones del hospedero enriqueciéndolo con microorganismos que se asocien a él. Por esta razón, la integración

de microbiomas benéficos en los sistemas agrícolas ofrece la posibilidad de mejorar en gran medida la eficiencia de la producción vegetal (Bakker et al., 2012; Busby et al., 2017; Mueller & Sachs, 2015; Nogales et al., 2016; Schlaeppli & Bulgarelli, 2014; Wagner et al., 2014). Sin embargo, se recomienda que, cuando el objetivo sea el beneficio de la planta y de la agricultura, se estudie y se actúe primero a partir de cepas individuales, para luego pasar a consorcios microbianos, hasta llegar finalmente a todo el microbioma (Busby et al., 2017).

La coordinación del estudio de microbiomas de plantas en un contexto agrícola ha sido impulsada por diferentes asociaciones científicas, iniciativas y proyectos internacionales (Alivisatos et al., 2015; Gilbert, Jansson, & Knight, 2014; Phytobiomes, 2016; Reid & Greene, 2013; Stulberg et al., 2016). A través de estas iniciativas, se han encontrado brechas de conocimiento y prioridades de investigación en el área de microbiomas de plantas con metas altamente específicas: acelerar la integración de los microorganismos asociados a las plantas en la agricultura sostenible, involucrar a los agricultores desde el inicio del proceso (Busby et al., 2017; Cook, 2007) y buscar la estandarización de los procedimientos de colecta, procesamiento y análisis de datos.

Es así como, recientemente, Busby y colaboradores (2017) plantearon cinco prioridades de investigación en microbiomas agrícolas orientadas a acelerar la capacidad para diseñar e implementar manipulaciones efectivas de microbiomas agrícolas y estrategias de manejo que beneficien tanto a los consumidores como a los productores. Estas prioridades son las siguientes:

1. Desarrollar sistemas modelo de microbioma-hospedero para plantas cultivadas y plantas no cultivadas con colecciones de cultivos microbianos asociados y genomas de referencia. Para esto, se requieren esfuerzos coordinados que permitan el establecimiento de repositorios y bases de datos curadas que conduzcan a dilucidar las interacciones planta-microbioma y a establecer una base de conocimientos necesaria para una innovación sostenible y una agricultura de alto rendimiento.

2. Definir microbiomas y metagenomas núcleo en dichos modelos, que ayuden a identificar los microorganismos asociados a las plantas que deberán ser priorizados para investigación. La definición del microbioma-núcleo permitirá refinar el enfoque sobre taxones estables que tengan una mayor probabilidad de influir en el fenotipo del hospedero y de responder a desafíos ambientales específicos.
3. Elucidar las reglas del ensamblaje y la resiliencia de microbiomas. Para esto es esencial determinar las condiciones bajo las cuales los microorganismos se asocian en comunidades, sin perder de vista la complejidad de estas y la ecología de los microorganismos asociados a las plantas. Además, es importante considerar el método de inoculación y la capacidad de colonización o resiliencia de la comunidad, la cual dependerá del medioambiente y de factores abióticos (temperatura, luz, acidez, nutrientes y disponibilidad de agua) y bióticos (competencia, depredación, parasitismo y mutualismo).
4. Determinar los mecanismos funcionales de las interacciones planta-microbioma. Para esto, se requiere de un conocimiento profundo de los aspectos funcionales y de los mecanismos de las interacciones entre los microorganismos, las plantas, el ambiente y las prácticas de manejo agrícola. Se requiere aquí de avances significativos en enfoques experimentales, técnicas de caracterización avanzada y modelización (Lebeis, 2015; Widder et al., 2016).
5. Caracterizar y refinar las interacciones entre el genotipo de la planta x , el ambiente x , el microbioma x y sus interacciones. Esto representa un gran reto para el diseño de tratamientos de microbiomas que sean resistentes a la tremenda variabilidad ambiental presente y que tengan capacidad competitiva con respecto a la comunidad microbiana circundante, la

cual puede variar drásticamente entre las fincas o localidades, en la respuesta a las prácticas de manejo agronómico (Soman, Wander, & Kent, 2017) y según el cambio climático (Barnard, Osborne, & Firestone, 2013; DeAngelis et al., 2015).

Gracias a una iniciativa y esfuerzo en conjunto de investigadores apoyados por la Sociedad Americana de Fitopatología (APS, por su sigla en inglés), en 2013 se creó una hoja de ruta para la investigación y la aplicación en el campo llamada *Phytobiomes* (traducido del inglés como Fitobiomas). Este proyecto surgió como respuesta al incremento global en las demandas de alimentos, forrajes y fibra, y a un mundo vulnerado por eventos de cambio climático extremo, que ha ido dejando y dejará en un futuro no muy lejano pocas tierras cultivables, insumos insostenibles de fertilizantes, disponibilidad incierta de agua y bajos rendimientos de los cultivos (Phytobiomes, 2016).

En esta hoja de ruta se describe un plan estratégico para adquirir conocimiento de lo que constituye un agroecosistema saludable, productivo y sostenible, y para traducir ese conocimiento en herramientas nuevas y poderosas que entren a formar parte de las estrategias de manejo de cultivos. Esto podría lograrse a través de una comprensión de las redes que resultan de las interacciones entre las plantas, su entorno (suelo, aire, agua y clima) y las comunidades complejas de organismos (macro- y micro-) (Phytobiomes, 2016).

Hoy en día, los avances conceptuales y tecnológicos en diversos campos de investigación —como las ciencias ómicas, la biología de sistemas, la ecología microbiana, la ciencia de datos y los sistemas de manejo de cultivos de precisión— están posicionando a los investigadores para lograr grandes avances en la caracterización, análisis y manejo de fitobiomas como sistemas integrados (Leach, Triplett, Argueso, & Trivedi, 2017; Phytobiomes, 2016).

¿Por qué estudiar el microbioma?

En los últimos años, el estudio del papel desempeñado por las comunidades asociadas a las plantas ha ganado un enorme interés en el área agrícola, debido a la creciente evidencia de que estas comunidades pueden

afectar el desarrollo, productividad y resiliencia de los cultivos (Berg et al., 2013; Bulgarelli et al., 2013; Mendes et al., 2014). Incluso, algunos estudios recientes muestran que el microbioma puede tener

un efecto directo en la fenología de las plantas, tal como se describe en el trabajo con *Boechera stricta* (Wagner et al., 2014), en el que se demuestra que los microorganismos asociados a la raíz tienen un efecto directo sobre el tiempo de floración. También en estudios de trasplante de microbioma de raíz entre especies estrechamente relacionadas como *Arabidopsis thaliana* y *Brassica rapa*, se generaron cambios en el tiempo de floración de la planta receptora, los cuales resultaron similares a los observados en la planta donadora (Panke-Buisse, Poole, Goodrich, Ley, & Kao-Kniffin, 2015).

Así, pues, la manipulación del microbioma vegetal podría llevar al desarrollo de tecnologías y prácticas agrícolas más sostenibles: control de enfermedades (Andrews, 1992; Bloemberg & Lugtenberg, 2001), aumento de la producción agrícola (Bakker et al., 2012), disminución en el uso de los insumos químicos (Adesemoye et al., 2009) y reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (Singh et al., 2010).

Un factor importante para la consolidación de los estudios del microbioma de las plantas y su potencial para el uso agrícola ha sido la disponibilidad de nuevas herramientas como la secuenciación masiva de ADN. Estas tecnologías han permitido, de forma efectiva y económicamente viable, realizar estudios independientes de cultivo de las comunidades establecidas en los distintos tejidos. También han permitido establecer qué microorganismos están presentes en los tejidos de las plantas (p. ej., secuenciación de genes marcadores moleculares), cuáles son sus posibles funciones (p. ej., genomas, metagenomas) y cómo expresan estas funciones frente a distintas condiciones ambientales (p. ej., transcriptomas y metatranscriptomas).

El uso de estas nuevas herramientas para el estudio del microbioma tiene el potencial de impactar en la detección de nuevos organismos para el control y en el seguimiento de los bioproductos y su efecto en campo (Berg et al., 2013). El efecto de los desarrollos tecnológicos en el estudio del microbioma de plantas se ve reflejado en el creciente número de publicaciones sobre el tema: mientras que en el periodo 2008-2010 se publicaron alrededor de 50 artículos científicos relacionados con los términos “microbiomas de plantas”, en el periodo 2014-2016 se han publicado

más de 600 (Google Académico, s. f.). Esto muestra el enorme interés en explorar, identificar, entender y aprovechar los microbiomas como una nueva fuente de diversidad genética y funcional para mejorar la productividad agrícola.

Los fitobiomas, una nueva alternativa para la agricultura

El fitobioma está compuesto por plantas, su medioambiente y diversos organismos macro- y microscópicos que interactúan e influyen en la salud y productividad de las plantas. Estos organismos forman redes complejas que se establecen y se regulan a través del ciclo de los nutrientes, la competencia, el antagonismo y la comunicación química mediada por una diversa gama de moléculas de señalización. La integración del conocimiento de los mecanismos de señalización, de los miembros del fitobioma y de sus redes conducirá a una nueva comprensión de la función e importancia de estas señales en el ecosistema. Tal entendimiento podrá conducir a nuevas estrategias biológicas, químicas y de fitomejoramiento dirigidas a optimizar la salud y la productividad de los cultivos.

Especificidad del microbioma en los distintos tejidos

Una de las observaciones interesantes derivada de los estudios de diversidad molecular es que los distintos órganos de las plantas —por ejemplo, la rizosfera (raíces), la filosfera (la zona aérea), la endosfera (tejidos internos) y la carposfera (frutos)— están colonizados por microorganismos y que distintos tejidos parecen favorecer el reclutamiento de comunidades microbianas distintas. Las comunidades bacterianas son abundantes en los distintos tejidos de la planta, por ejemplo, se ha estimado que existen de 10^6 a 10^7 células/cm² en la superficie de las hojas y de 10^6 a 10^9 células/g en la rizosfera (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Estos ensamblajes de comunidades no son producto del azar, sino que parecen estar determinados por la anatomía de las hojas y raíces y por la producción de exudados en estos tejidos (Berg et al., 2016).

La rizosfera se caracteriza por su elevada abundancia de comunidades microbianas (Berg, Eberl, & Hartmann, 2005) y es tal vez uno de los ambientes más estudiados, en especial, porque los microorganismos presentes en la raíz promueven un mejor aprovechamiento de los nutrientes y pueden afectar positivamente la salud de la planta evitando el desarrollo de enfermedades. Una de las características interesantes de la rizosfera es su capacidad de reclutar del suelo especies microbianas específicas. Esta selección específica de microorganismos ha sido demostrada con metodologías como el enriquecimiento isotópico (Haichar et al., 2008) y la comparación por secuenciación de 16S rARN de las comunidades microbianas. Tales metodologías han indicado que la acción combinada de las interacciones microorganismo-microorganismo y microorganismo-hospedero estimula la diferenciación de la microbiota en la interfaz raíz-suelo e impulsa el establecimiento de la microbiota de la raíz, a través de procesos fisiológicos específicos de la biota del suelo circundante (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012).

De igual forma, la localización espacial de los microorganismos en la raíz y su relación con la distribución de nutrientes ha sido demostrada por microscopía, con metodologías como FISH o hibridación fluorescente *in situ* (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012; Ofek, Hadar, & Minz, 2012). Esta co-localización de nutrientes señala que las asociaciones entre la raíz y los microorganismos se dan por comunicación química, en la que están involucradas la acumulación de mucílago y de exudados de metabolito secundario con la capacidad de atraer o repeler microorganismos (Badri & Vivanco, 2009) e, incluso, mecanismos de defensa (Doornbos, Van Loon, & Bakker, 2012).

Estos mecanismos de comunicación y de reclutamiento del microbioma parecen ser particulares de cada especie, como se observó en estudios comparativos de la diversidad de la rizosfera de dos plantas medicinales, cultivadas en suelos adyacentes con las mismas condiciones. En dicho estudio, a pesar de la proximidad de las plantas, se encontró hasta un 30 % de diferencias en la diversidad microbiana asociada a la raíz, al igual que diferencias funcionales en los organismos colonizadores del tejido (Köberl, Schmidt, Ramadan, Bauer, & Berg, 2013). Además de la importancia para la planta, se sabe que las

comunidades de microorganismos en la rizosfera también son importantes para los ecosistemas terrestres, ya que catalizan procesos como la fijación de carbono, que es fundamental para el funcionamiento y ciclo de los nutrientes (Berg et al., 2014c).

En comparación con la rizosfera, la abundancia microbiana en la filosfera es menor. Esto se debe a que las hojas son un ambiente más dinámico, con un menor tiempo de vida que las raíces, un menor número de nutrientes y una mayor exposición a cambios de humedad, radiación y temperatura (Vorholt, 2012). Las hojas tienen diferentes estrategias y estructuras que afectan la colonización microbiana, como las capas de cera y la producción de compuestos secundarios, que tienen efecto antimicrobiano (Berg et al., 2016). Tal vez por la presencia de estas estructuras, la escasez de recursos y la variabilidad de las condiciones, la colonización de las superficies de las hojas se da en grupos pequeños de agregados, los cuales se forman principalmente en las uniones de las células epidérmicas, a lo largo de las venas y en las bases de tricomas (Lindow & Brandl, 2003).

La colonización y establecimiento del microbioma de la filosfera está determinado por las condiciones ambientales y biológicas. Un estudio realizado en el periodo de crecimiento (julio-agosto) de los cultivos de frijol, soya y canola muestra que durante esta etapa las variables climatológicas de las estaciones influyeron en la composición y maduración del microbioma de la filosfera (Copeland, Yuan, Layeghifard, Wang, & Guttman, 2015). Al principio, su composición se vio fuertemente influenciada por los microorganismos del suelo, sin embargo, a medida que transcurrió la temporada, la comunidad se volvió menos diversa y más específica, con la presencia de microorganismos de la familia Methylobacteriaceae, encontrados comúnmente en la filosfera.

Otro estudio reciente, esta vez en 57 especies de árboles en bosques neotropicales, muestra la relación de la microbiota asociada a la filosfera con los atributos biológicos de los árboles (Kembel et al., 2014). En dicho estudio, se encontró relación entre la estructura del microbioma y variables como la fisiología de la planta, la relación evolutiva, la densidad de la madera, la densidad de la hoja y las concentraciones de nitrógeno y fósforo en las hojas. Entre estos atributos,

la concentración de nitrógeno y fósforo es la que parece tener un mayor efecto sobre el microbioma. Esto se debe posiblemente a que tales valores representan una medida de la estrategia de toma y retención de nutrientes por parte de la planta, lo cual se refleja en la estructura de las hojas y afecta la composición de la microbiota. Lo anterior muestra la complejidad de las fuerzas que modulan el establecimiento del microbioma de la filósfera y evidencian que es necesario evaluar los factores bióticos y abióticos en futuros estudios para dilucidar las fuerzas que determinan su composición y dinámica.

Otra área de trabajo en la investigación de la microbiota es el estudio de los frutos o la carposfera. Debido a la relación directa con la producción agrícola, el estudio en este tema se ha venido desarrollando en varias direcciones, desde su interacción con insectos plaga hasta su estudio para evitar pérdidas asociadas a la infección por microorganismos que se desarrollan durante los procesos de poscosecha.

Un estudio reciente en manzanas cosechadas evaluó la diversidad fúngica de estas en distintas partes del fruto y su relación con las prácticas de manejo orgánico y convencional (Abdelfattah, Wisniewski, Droby, & Schena, 2016). En este estudio se evaluaron las frutas poco después de su compra (T1) y después de dos semanas de almacenamiento (T5). Los análisis de diversidad revelaron poblaciones significativamente diferentes en las manzanas orgánicas frente a las convencionales, e incluso detectaron varios taxones únicos exclusivamente en las manzanas orgánicas, lo que sugiere que las prácticas de manejo agronómico pueden ser un factor determinante de los taxones presentes.

Sin embargo, a pesar de estos resultados, solo se revelaron pequeñas diferencias en los dos tiempos de evaluación (T1 y T5), lo cual fue consistente en todas las partes de la fruta investigadas (extremo del cáliz, cáscara, extremo del vástago y carne herida). Los resultados de este estudio representan un avance de los conocimientos actuales sobre la microbiota de hongos en tejidos de fruta y muestran la importancia del manejo en la diversidad final del microbioma del fruto. Incluso, dan a conocer alternativas de estudio interesantes para el diseño de nuevas estrategias de control que modulen el establecimiento de un microbioma controlador de enfermedades de poscosecha.

El microbioma en el control biológico

A pesar de la ubicuidad de los microbiomas asociados a los distintos tejidos y a su posible rol en la salud de las plantas, la mayoría de los estudios en control biológico se han enfocado principalmente en el entendimiento de interacciones simples, planta-patógeno, planta-patógeno-agente controlador. Aunque estas aproximaciones han permitido entender múltiples mecanismos de control de enfermedades y seleccionar microorganismos, omitir la influencia del resto de la comunidad microbiana puede sesgar la aplicación óptima de estos bioproductos. Por ejemplo, una de las grandes limitantes de los biocontroladores es la baja reproducibilidad de los resultados cuando se aplican en distintos lugares. Varios autores sugieren que gran parte de esta variabilidad se debe precisamente a que no se conoce si la microbiota local de las plantas afecta de forma positiva o negativa la respuesta de los agentes biocontroladores (Massart, Martínez-Medina, & Jijakli, 2015). Entender el efecto del microbioma en la planta puede ayudar a privilegiar el uso de agentes biológicos sobre el de compuestos químicos (muchas veces nocivos para el medioambiente).

Se han propuesto varias aproximaciones que permitirían aprovechar el uso del conocimiento del microbioma en el área de control biológico. Una estrategia de prevención busca esclarecer si las interacciones microbiota-patógeno-planta (es decir, la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis y la estimulación de la respuesta sistémica del hospedero) pueden suprimir la proliferación de patógenos (Berg et al., 2016). Por ejemplo, muchos patógenos bacterianos foliares colonizan las superficies de las plantas antes de la infección, y el tamaño de las poblaciones resultantes se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Esto sugiere que un microbioma compuesto por poblaciones competidoras en la filósfera puede reducir el establecimiento y colonización del patógeno, y favorecer, así, la protección de las plantas.

Uno de los casos más relevantes en la prevención de las enfermedades es el de la supresión del desarrollo de patógenos en ciertos suelos denominados *supresivos* (i. e., que impiden el desarrollo de enfermedad). Tales suelos han sido reportados alrededor del mundo, con

una clara evidencia de la contribución de la microbiota en los resultados. Existen principalmente dos tipos de supresividad: la supresividad general, debida al efecto de la biomasa total de microorganismos, y la supresividad específica, debida a la acción específica de poblaciones de microorganismos (Weller, Raaijmakers, Gardener, & Thomashow, 2002). Esta última, es de gran interés en el control biológico, ya que la identificación de estas poblaciones, el entendimiento de sus funciones e interacciones y la recuperación de estas comunidades pueden emplearse para reducir la severidad de las enfermedades en los cultivos. Los mecanismos de supresividad específica incluyen la interacción de supresión directa sobre un patógeno (en el que los microorganismos del suelo inhiben el establecimiento de este) y la supresividad indirecta (en la que el microbioma estimula el sistema inmune de la planta) (Lugtenberg, Chin-A-Woeng, & Bloemberg, 2002).

La existencia de suelos con comunidades supresoras ha sido reportada para múltiples cultivos (papa y manzana, por ejemplo), desde mediados del siglo pasado. Algunos estudios en papa reportaron la presencia de agentes atenuadores de la enfermedad de la costra negra de la papa en suelos que llevaban mucho más tiempo de producción que en aquellos con menos de 15 años (Menzies, 1959). En dichos estudios se demostró que, a través del tiempo, el suelo desarrollaba supresividad a la enfermedad y que esta desaparecía cuando el suelo era esterilizado, lo que suponía una importante influencia biológica.

Dichos estudios fueron las primeras evidencias que abrirían la puerta para muchos otros trabajos que han demostrado la importancia del factor microbiológico del suelo en el desarrollo de las enfermedades. Para una revisión completa de la historia de la supresividad, véase Weller et al. (2002). Más recientemente, un estudio en remolacha ha demostrado, por medio de técnicas dependiente e independiente de cultivo, que los microorganismos de la clase gamma-proteobacteria presentes en la rizosfera conllevan una clara actividad supresiva contra el patógeno *Rhizoctonia solani* (Mendes et al., 2012).

A pesar de la evidencia de la presencia de comunidades supresivas, delimitar y aprovechar estas comunidades implica importantes retos tecnológicos y de conoci-

miento, ya que es imposible poder recuperar en cultivo estas comunidades complejas y megadiversas. Por lo tanto, uno de los retos más grandes es poder identificar cuáles organismos, dentro de la enorme diversidad, son fundamentales y necesarios para generar el efecto supresivo. La evidencia en *Arabidopsis thaliana* sugiere que para desfavorecer o suprimir el desarrollo de enfermedades no es necesaria la presencia de todos los organismos de la comunidad, sino que basta con la presencia de algunas especies clave para ayudar a establecer los demás microorganismos (Aglar et al., 2016).

En la misma línea, algunos autores sugieren que inocular microorganismos clave colaboradores (“cepas auxiliares”) junto con los biocontroladores puede aumentar la efectividad (Massart et al., 2015), ya que las comunidades microbianas pueden influir directamente en el desarrollo de antibiosis, parasitismo o competencia, pero también pueden tener un papel indirecto al estimular las defensas de las plantas o la supervivencia y la actividad de los agentes biocontroladores. Una mejor comprensión del microbioma también permitirá identificar estas “cepas microbianas auxiliares” que potencian la eficacia de los agentes biocontroladores.

¿Qué son los fitobiomas?

Se denomina *fitobioma* al sistema conformado por una planta, su medioambiente, sus micro- y sus macroorganismos asociados. Estos organismos —que pueden estar dentro, en la superficie o adyacentes a las plantas— incluyen una gran diversidad de microorganismos (virus, bacterias, hongos, oomicetos y algas), animales (artrópodos, gusanos, nematodos y roedores) y otras plantas (Phytobiomes, 2016). El ambiente hace referencia al entorno físico y químico (suelo, aire, agua y clima) que influye en las plantas y sus organismos asociados (Phytobiomes, 2016). Todos estos componentes interactúan entre ellos, de modo que influyen en la sanidad del suelo, en las plantas, en el agroecosistema y en la productividad. Como resultado de esta interacción, los organismos (macro- y micro-) forman redes complejas que se establecen y regulan a través del ciclo de los nutrientes, la competencia, la depredación, la patogénesis, el mutualismo

y la comunicación química mediada por una diversa gama de moléculas de señalización (Leach et al., 2017). Es así como el conocimiento integrado de los mecanismos de señalización de cada uno de los

miembros del fitobioma y de las redes que se originan entre ellos puede convertirse en una alternativa de estrategias de control, de mejoramiento de la sanidad vegetal y de la productividad agrícola (figura 4.1).

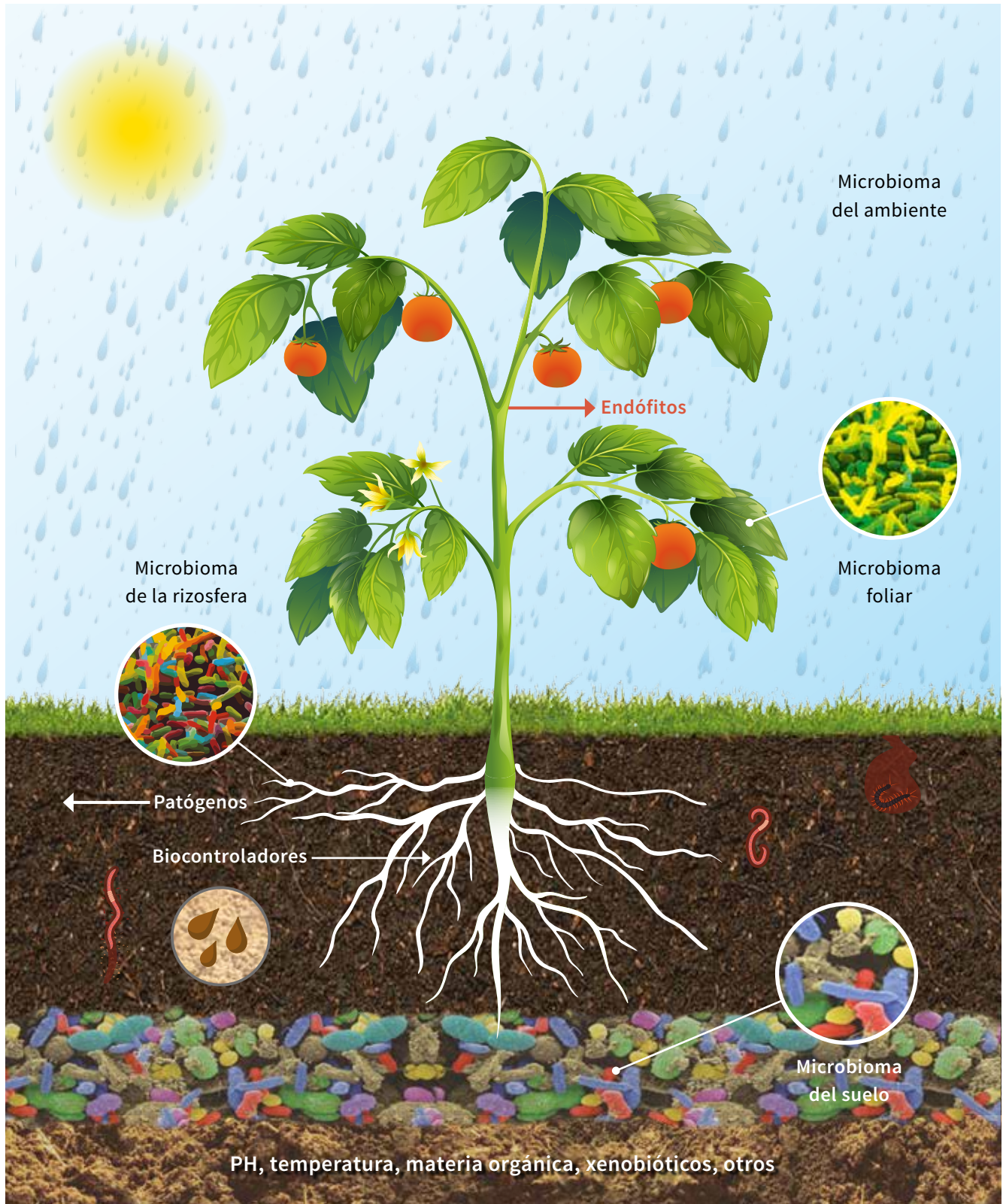


Figura 4.1. Interacciones del fitobioma con los factores fisicoquímicos del entorno.

Fuente: Elaboración propia

¿Qué se conoce de los fitobiomas?

El conocimiento actual que se tiene sobre los fitobiomas se ha reunido a partir de las investigaciones realizadas por científicos de diferentes disciplinas, entre ellos, fisiólogos de plantas, fitopatólogos y entomólogos, que han elucidado las interacciones existentes entre fitopatógenos y plagas, e incluso las vías por las que estos manipulan las defensas de las plantas. También los microbiólogos han realizado aportes mediante la identificación de las interacciones benéficas que aumentan dramáticamente el acceso de las plantas al agua, al nitrógeno utilizable y al fósforo (Phytobiomes, 2016).

Por otra parte, la comunidad científica está avanzando rápidamente en la comprensión del microbioma de la planta —componente prominente de los fitobiomas—, gracias al rápido desarrollo de las ciencias ómicas y de los avances conceptuales en este tema. Del mismo modo, los investigadores en suelos han definido los procesos fundamentales para la formación de estos, de su fertilidad y del ciclo de los nutrientes; mientras que los fitomejoradores, los agrónomos y los cultivadores han establecido los sistemas de producción que han conducido a una época de notable crecimiento agrícola (Phytobiomes, 2016). Sin embargo, este crecimiento se ha visto limitado por una escasa comprensión de los fitobiomas. Entender cómo los fitobiomas se reúnen, funcionan e impactan la salud de las plantas y los ecosistemas en su conjunto ampliará enormemente el número de herramientas para el manejo de cultivos.

¿Cómo es la comunicación en el fitobioma?

La comunicación o interacción dentro y entre los organismos es la pieza clave que integra la función del fitobioma. Algunas interacciones están mediadas por señales físicas, tales como la vibración o bloqueo de la luz, pero la mayoría son de naturaleza química: lípidos, péptidos, polisacáridos y metabolitos volátiles (Leach et al., 2017). La comunicación puede ocurrir a través de la degradación de señales, mimetismo o inhibición por parte de otros miembros de la comunidad, lo que

incluye plantas, bacterias, hongos e insectos (Leach et al., 2017). Las plantas producen señales emitidas en radicales o exudados foliares que son percibidas por otros miembros de la comunidad. Las plantas también perciben señales de diversos miembros de la comunidad que activan o mejoran las respuestas localizadas o sistémicas y que culminan en cambios en su desarrollo, salud y productividad (Leach et al., 2017).

Las interacciones bióticas de los fitobiomas mediadas por señalización, antagonismo o cooperación para obtener recursos tienen importantes implicaciones para las plantas. La conectividad inter-reino entre las especies clave en las redes de fitobiomas puede regular el ensamblaje de la comunidad y la aptitud de las plantas (Agler et al., 2016). Esto ha comenzado a aplicarse a la ecología de la restauración, donde se ha demostrado que la inoculación con microbiota de suelo de diferentes ambientes sobre praderas para restauración influye en la composición de las especies de plantas que se inician allí (Wubs, Van der Putten, Bosch, & Bezemer, 2016).

Un estudio a gran escala de la sucesión de praderas después del abandono de los campos agrícolas demostró que los grupos existentes de biota del suelo —la cual incluye hongos, bacterias, microartrópodos, nematodos y plantas— estaban cada vez más conectados y eran cada vez más eficientes en la captura de carbono a través del tiempo, en especial, cuando la composición de las especies de plantas había sido casi la misma (Morriën et al., 2017). Vincular estas relaciones bióticas con las vías de comunicación que se generan entre todos los organismos implicados, para establecerlas y regularlas, es una estrategia que podría beneficiar no solo la productividad de los cultivos, sino también la resistencia de estos a las enfermedades (Leach et al., 2017; Lehman et al., 2015).

El conocimiento que se tiene actualmente sobre las comunicaciones entre los organismos que conforman el fitobioma se ha basado principalmente en la interacción entre dos o tres miembros y se han estudiado, en gran medida, a nivel de laboratorio o invernadero. Sin embargo, el hecho de que las señales puedan ser capturadas, modificadas o incluso destruidas por otro miembro de la comunidad refuerza la necesidad de un análisis a nivel de sistemas de comunicación dentro del fitobioma (Leach et al., 2017).

De hecho, las predicciones de señalización son cada vez más confiables, gracias a las tecnologías de punta y al análisis de proteomas, de metabolomas y a la biología de sistemas, que contribuyen a la comprensión de todo el sistema y, por lo tanto, al mejoramiento de los cultivos.

A pesar de que se están descubriendo los diferentes eventos de señalización que ocurren entre los miembros del fitobioma, no es claro aún si las comunidades evolucionan juntas para modular o compensar las señales

del otro, en beneficio de la máxima supervivencia de la planta, ya que muchas de las señales que ocurren entre los miembros son contradictorias y, a la vez, simultáneas.

Es por esta razón, que Leach et al. (2017), en su revisión sobre la comunicación en el fitobioma, afirman que “una imagen a nivel de sistemas de eventos de señalización es necesaria para entender si las plantas están conduciendo una sinfonía de señalización o gritando en una multitud cacofónica”.

Estudios de caso

La composición espacial de la comunidad fúngica asociada a la manzana: una herramienta para el diseño de nuevas estrategias de control de enfermedades

Los frutos como la manzana son el hábitat natural de múltiples hongos. En algunos casos, la colonización de sus tejidos por parte de estos es imprescindible para completar su ciclo de vida. Varios de estos hongos pueden ser considerados como patógenos y, en muchos casos, son los causantes del deterioro de la calidad de las frutas durante el proceso de poscosecha, razón por la cual generan grandes pérdidas económicas. No obstante, no todos los hongos residentes en los tejidos generan deterioro o enfermedad, incluso estos organismos pueden ser considerados como benéficos, debido a que llegan a controlar el desarrollo de enfermedades. Algunos endófitos, como *Cryptococcus*, por ejemplo, disminuyen la severidad de las enfermedades que afectan el fruto. Por lo tanto, entender las comunidades asociadas a los frutos, la complejidad de las interacciones entre las poblaciones microbianas, el tejido de la planta y los patógenos permite el desarrollo de alternativas para reducir las pérdidas económicas durante el proceso de poscosecha.

Las prácticas de cultivo —además de afectar la productividad y la calidad de los frutos— inciden en la colonización y ensamblaje de comunidades. Algunos estudios, como el de Camatti-Sartori et al. (2005), han documentado el efecto del manejo orgánico y el convencional sobre las comunidades de hongos endófitos y filamentosos en manzanas. En el trabajo de estos autores, el uso de técnicas convencionales de

cultivo de microorganismos permitió concluir que el manejo orgánico favorece un mayor establecimiento de hongos endófitos. No obstante, un mejor entendimiento del efecto de las prácticas de cultivo sobre el ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a los frutos como la manzana requiere de estudios que permitan muestrear la diversidad total de la comunidad por medio de metodologías independientes de cultivo.

En este contexto, se presenta como estudio de caso el trabajo realizado en manzanas por Abdelfattah et al. (2016), quienes demuestran la utilidad de las herramientas independientes de cultivo para entender las interacciones de las comunidades y el efecto de las prácticas de cultivo sobre la diversidad y distribución espacial de los microbiomas de las manzanas en anaquel.

En este estudio se evaluaron manzanas Red Delicious con distintos tipos de manejo (convencional y orgánico), obtenidas de un mercado local en el estado de Washington (Estados Unidos). Las frutas fueron procesadas el día 1 y 5 de la compra, separando tres tejidos, el cáliz (CE), el pedúnculo (SE) y la zona ecuatorial de la fruta (figura 4.2a). La zona ecuatorial de la fruta se subdividió en otros dos tejidos: el mesocarpio, donde se generó una herida artificial (WF), y la piel de la fruta (PE). Se realizaron réplicas biológicas y los tejidos fueron liofilizados.

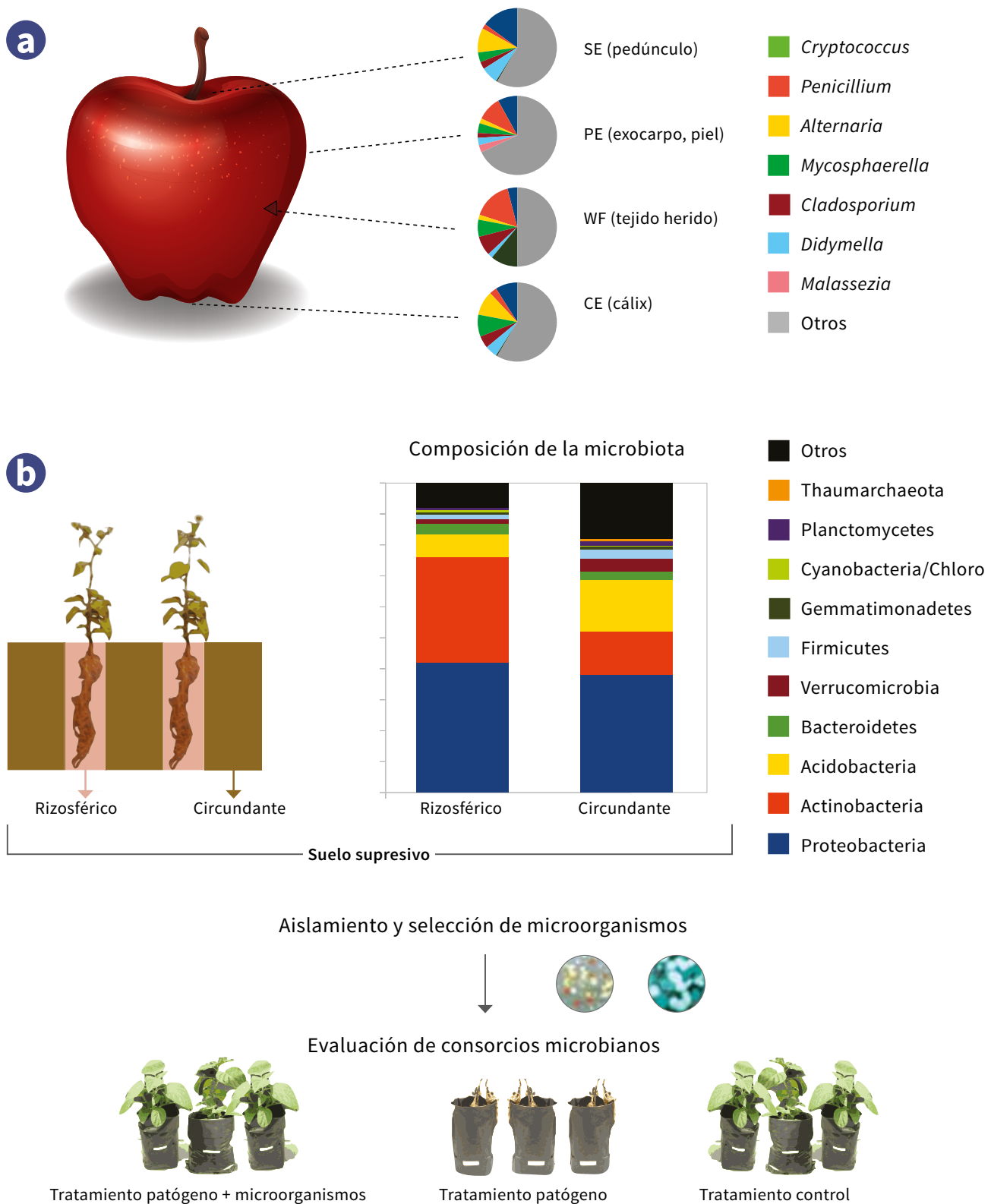


Figura 4.2. Estudios de caso de microbiomas como herramienta para el diseño de nuevas estrategias de biocontrol. a. Estudio de la microbiota asociada a los frutos de manzana, importancia de las distintas partes del fruto que albergan comunidades de hongos patógenos (p. ej., *Alternaria*) e identificación de posibles biocontroladores (p. ej., *Cryptococcus*); b. Estrategia de control de patógenos de uchuva basada en el estudio del microbioma a partir de la identificación de suelos supresivos, de técnicas independientes de cultivo y de aislamiento, y del uso de consorcios microbianos para el control del marchitamiento vascular producido por *Fusarium oxysporum*.

Fuente: Elaboración propia

Con estos tejidos se realizó la extracción de ADN y la amplificación de la región ITS 2 por medio de PCR con los *primers* ITS3_KYO2 y ITS4 (Toju, Tanabe, Yamamoto, & Sato, 2012), los cuales incluyeron los adaptadores para la secuenciación con plataformas Illumina. Los productos de estas amplificaciones fueron llevados al secuenciador Illumina MiSeq. Las secuencias de ITS obtenidas se examinaron con la herramienta de análisis de amplicones Qiime y la asignación taxonómica se realizó mediante búsqueda de homología (Blast) contra las bases de datos de GenBank (NCBI, 2017) y Fungal Barcoding Databases (Fungal Barcoding, 2017).

Los análisis de las lecturas mostraron que el número de grupos taxonómicos de hongos detectados en unidades taxonómicas operacionales (UTO) se encuentran entre 80 y 450. Los tejidos con mayor diversidad de grupos fueron la piel del fruto, el mesocarpio y el pedúnculo, mientras que el cáliz (CE) presentó la menor diversidad de UTO. La mayoría de las lecturas fueron asignadas al filo Ascomycota (69,3 %), seguido por los Basidiomycota (29,5 %).

Para el filo Ascomycota, se identificaron miembros de las clases Dothideomycetes y Eurotiomycetes (42,6 % y 10,6 %, respectivamente), seguidas por las clases Sordariomycetes (6,1 %), Saccharomycetes (4,2 %) y Leotiomycetes (2,4 %). En el caso de los Basidiomycota, las lecturas presentaron principalmente miembros de las clases Tremellomycetes (13,5 %) y Ustilaginomycetes (2,1 %) (figura 4.2). En resumen, los géneros más abundantes fueron, *Cryptococcus* (9,20 %), *Penicillium* (8,00 %), *Alternaria* (6,60 %), *Mycosphaerella* (6,30 %), *Cladosporium* (5,10 %), *Didymella* (4,70 %) y *Malassezia* (4,60 %).

Estos patrones de diversidad mostraron diferentes poblaciones de hongos en las distintas zonas de una misma fruta (CE, SE, WF y PF). Estas diferencias de las comunidades no son producto del azar, sino que parecen estar relacionadas con las condiciones de nicho provistas por cada región de la fruta, lo cual es evidente debido a que las mismas zonas de distintas frutas muestran patrones poblacionales similares. Incluso, aquellos tejidos que presentan una topología similar, como el pedúnculo (SE) y el cáliz (CE), presentaron comunidades similares. Esto se puede deber a que dichos lugares ofrecen mayor

protección a los microorganismos de los rayos UV y de otras condiciones adversas.

El estudio de Abdelfattah et al. (2016) también señaló que existe un efecto claramente distinto entre el manejo convencional y el orgánico sobre la diversidad de hongos en el fruto, puesto que en las frutas con manejo convencional se encontró una menor diversidad de hongos, la cual parece estar asociada al efecto de los químicos utilizados. Otra observación interesante es que el tiempo de análisis después de la compra de los frutos (día 1 y día 5) no parece tener un efecto importante sobre la composición de hongos, lo que sugiere que es la comunidad establecida desde un principio en la fruta la que determina la diversidad.

Desde el punto de vista tecnológico, entender la composición de las comunidades de hongos puede ayudar a detectar organismos antagónicos de patógenos o a detectar los reservorios de hongos patogénicos. Por ejemplo, el análisis de la diversidad detectó la presencia de posibles levaduras antagonistas como *Cryptococcus*, *Metschnikowia* y *Wickerhamomyces*. Entre estas, *Cryptococcus* fue detectado en múltiples muestras y con una alta abundancia, lo cual es interesante puesto que varias cepas de esta levadura han sido estudiadas como agentes biocontroladores en manzana frente a *Penicillium expansum* (Hashem, Alamri, Hesham, Al-Qahtani, & Kilany, 2014). De forma similar, el análisis de las distintas zonas de las frutas permitió identificar aquellas zonas con mayor abundancia de posibles patógenos, por ejemplo, se detectó *Alternaria* en mayor cantidad en el cáliz y en el pedúnculo (CE y SE), en comparación con los otros tejidos; distribución que concuerda con los patrones de colonización y patogenicidad descritos para este hongo (Reuveni, Sheglov, Sheglov, Ben-Arie, & Prusky, 2002).

Este estudio demostró la importancia de entender las líneas fundamentales de la diversidad microbiana asociada a las plantas, pues permitió delimitar el efecto de la topografía del fruto sobre la distribución de los grupos taxonómicos de la comunidad de hongos, destacar el efecto de las técnicas de manejo sobre la diversidad y enfocar los estudios para la búsqueda y modulación de organismos biocontroladores de fitopatógenos (Wisniewski, Droby, Norelli, Liu, & Schena, 2016).

Biocontroladores vs. patógenos humanos y vegetales en estudios del microbioma

Las plantas son reconocidas como holobiontes debido a una estrecha relación simbiótica con su microbioma. Así como lo establecido en los seres humanos y en otros hospederos eucariotas, las plantas también albergan un “segundo genoma” que cumple funciones importantes en el hospedero. Estos enfoques influyen en diferentes campos de interés agrícola tales como el control biológico y la protección contra factores de estrés en la agricultura (figura 4.3). Las herramientas usadas para los estudios del microbioma pueden impactar 1) en la detección de nuevos recursos biológicos para el control de plagas y la promoción del crecimiento de las plantas, 2) en la optimización de procesos de fermentación y la formulación de bioplaguicidas, 3) en la estabilización del efecto biocontrolador en condiciones de campo y 4) en los estudios de evaluación de riesgo de los bioplaguicidas. Existe una cantidad importante de trabajos que presentan y discuten ejemplos de los campos mencionados anteriormente y de los bioproductos de próxima generación como una alternativa sostenible para la agricultura.

La composición del microbioma de la planta está influenciada por diferentes factores: la edad o etapa de desarrollo de esta, su especie o cultivar y la salud vegetal. Además, una multitud de factores abióticos modulan la diversidad estructural y funcional del microbioma asociado a la planta, por ejemplo, las propiedades del suelo, el estado nutricional y las condiciones climáticas (Berg & Smalla, 2009). Mediante el uso de técnicas de secuenciación de última generación se analizaron las huellas moleculares y se identificaron cepas particulares pertenecientes a comunidades microbianas de rizosfera específicas para varias especies de plantas (Berg & Smalla, 2009). Gracias a esto, se encontró que la rizosfera no solo contiene microorganismos benéficos, sino que puede contener un reservorio de patógenos humanos facultativos (Berg et al., 2005). De otra parte, varios estudios desarrollados permitieron establecer que todos los órganos de las plantas están colonizados por microorganismos (Berg, Erlacher, Smalla, & Krause, 2014a; Berg, Grube, Schloter, & Smalla, 2014b).

Sin embargo, los hábitats naturales tienen un bajo número de patógenos, por lo que la regla general de diversidad versus patogenicidad sugeriría que prevalece más el efecto biocontrolador y de promoción de crecimiento vegetal. Esta hipótesis se confirmó al encontrar altas proporciones de antagonistas potenciales en hábitats asociados a musgos (Opelt, Berg, & Berg, 2007), a especies endémicas en áreas naturales de conservación (Berg, Hartenberger, Liebinger, & Zachow, 2012) o relacionadas con hemiparásitos de plantas, como es el caso de las plantas parásitas florecientes que crecen unidas y dentro del sistema vascular de un árbol o arbusto (Zachow et al., 2009).

Los sistemas agrícolas, especialmente los monocultivos de manejo intensivo a menudo tienen una menor diversidad microbiana, con excepción de los microorganismos que estimulan la supresividad mediada por una sola comunidad microbiana. En estos casos, esta última responde al monocultivo, ejerce control biológico contra un patógeno específico y promueve el crecimiento vegetal. Tales comunidades microbianas han demostrado ser una excelente fuente de nuevos antagonistas.

De otra parte, los sistemas manejados orgánicamente contienen una alta proporción de microorganismos benéficos indígenas en comparación con los de agricultura convencional. Esto se demostró en cultivos de vid en los que *Aureobasidium pullulans*, un hongo biocontrolador capaz de detoxificar el cobre, se presentó de forma más abundante en las plantas manejadas orgánicamente que en aquellas manejadas con prácticas convencionales (Schmid, Moser, Müller, & Berg, 2011).

En sistemas agrícolas de zonas de desérticas, los suelos áridos presentan beneficios en su potencial microbiano que promueven la diversidad y la salud de las plantas. En dicho suelo se evidenció una mayor diversidad microbiana que derivó en plantas más saludables, aunque se observó una pérdida de bacterias extremófilas (Köberl, Müller, Ramadan, & Berg, 2011). De hecho, después de una actividad agrícola de largo

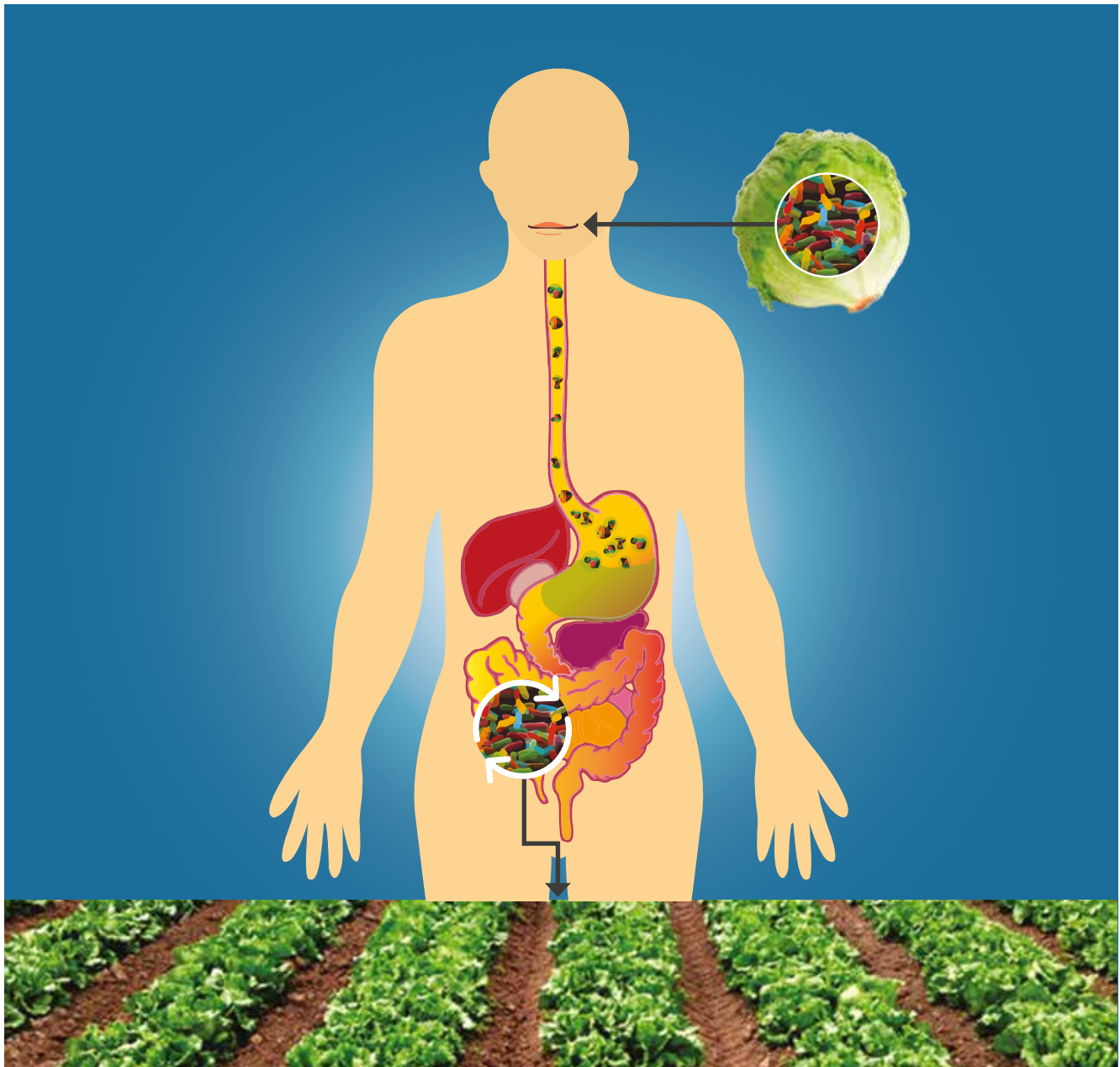


Figura 4.3. Vegetales y humanos: microbiomas compartidos.

Fuente: Elaboración propia

plazo en suelo desértico, se observaron cambios drásticos en las comunidades bacterianas. Por otra parte, en líquenes se demostró que estos organismos simbióticos (holobiontes) de larga vida a menudo se adaptan a condiciones abióticas extremas y albergan una alta proporción de antagonistas para protegerse contra parásitos fúngicos (Grube, Cardinale, De Castro, Müller, & Berg, 2009).

Las evaluaciones de riesgos son actualmente uno de los mayores obstáculos en el registro de bioproductos, ya que son estudios costosos que requieren mucho tiempo y, con frecuencia, resultan ineficientes si no

se consideran las características específicas de cada bioplaguicida. Para resolver este problema, se requiere una comunicación intensiva entre la administración, la industria y la investigación. Sin embargo, se espera que las nuevas herramientas que influyen en este campo conduzcan no solo a un mayor número de bioproductos registrados, sino también a prevenir brotes de patógenos oportunistas que a veces se ocultan en los productos que contienen antagonistas (Berg et al., 2005).

Además de estas nuevas herramientas, las técnicas de secuenciación de nueva generación utilizadas para el

estudio de los microbiomas permiten 1) detectar factores potenciales de patogenicidad en los bioplaguicidas y su resistencia a antibióticos a nivel genómico, 2) analizar el modo de acción y la participación de metabolitos mediante estudios transcriptómicos, 3) detectar metabolitos bioactivos a nivel genómico y transcriptómico y 4) estudiar el comportamiento de cepas biocontroladoras en el medioambiente con bibliotecas metagenómicas o de amplicones.

Un ejemplo de lo anterior se presenta con la secuenciación del genoma y los estudios transcriptómicos de *Stenotrophomonas rhizophila* (bacteria de protección contra el estrés osmótico), gracias a los cuales se logró optimizar los procesos de producción masiva, se identificaron nuevos modos de acción y se definieron factores de riesgo. Esta especie bacteriana tiene un gran potencial debido a su capacidad para promover el crecimiento de las plantas y para proteger las raíces contra factores bióticos y abióticos (Egamberdieva et al., 2011). Mediante diversas técnicas convencionales se han estudiado antibióticos, enzimas líticas y sustancias osmoprotectoras producidas por esta especie (Roder, Hoffmann, Hagemann, & Berg, 2005; Ryan et al., 2009), pero gracias al enfoque transcriptómico se han determinado nuevos mecanismos asociados con el estrés osmótico, como la producción y la excreción de glucosil-glicerol (GG) (Alavi, Starcher, Zachow, Müller, & Berg, 2013).

Estos resultados han generado no solo un gran valor para el registro del bioplaguicida basado en dicho microorganismo, sino que a su vez han demostrado que *S. rhizophila* ejerce una interacción planta-microorganismo beneficiosa. Dicha interacción fue confirmada utilizando genómica comparativa, transcriptómica y estudios fisiológicos, procedimientos en los cuales se compararon las siguientes cepas de *Stenotrophomonas*: *S. maltophilia* (patógeno resistente a múltiples fármacos), *S. maltophilia* R551-3 y *S. rhizophila* DSM14405T (ambos agentes biocontroladores) (Alavi, Starcher, Thallinger, Zachow, Muller, & Berg, 2014). Como resultado de este estudio, se encontró un alto grado de similitud de la secuencia entre los genomas de las tres cepas. Sin embargo, a pesar de la notable similitud en los factores potencialmente responsables de la invasión al hospedero y de la resistencia a antibióticos, no se

encontraron factores de virulencia ni proteínas de choque térmico en la cepa *S. rhizophila* asociada a la planta. Sí se encontraron, en cambio, genes únicos para la síntesis y el transporte de la espermidina (sustancia que protege a las plantas), así como enzimas degradantes de la pared celular y genes de tolerancia a la elevada salinidad (Alavi et al., 2014). Para el caso del patógeno humano oportunista *Stenotrophomonas maltophilia*, se encontraron potenciales factores de patogenicidad y se establecieron diferencias significativas entre ambas especies (Alavi et al., 2014).

El complejo biocontrol de *Ralstonia solanacearum*, patógeno de solanáceas

Como se ha mencionado anteriormente, la eficacia de los agentes de control biológico contra patógenos en el campo depende no solo de la capacidad antagonista del inóculo, sino de las interacciones de este con la planta, con la comunidad microbiana nativa, con las características fisicoquímicas del suelo y con las condiciones medioambientales (temperatura, humedad, etc.) en las que se desarrolla la planta. De hecho, productos comercializados que han mostrado previamente una alta eficacia biocontroladora en ensayos de invernadero, cuando se prueban en el campo no presentan los mismos efectos, factor que ha causado gran escepticismo entre los productores (Xue et al., 2009).

El problema radica en que su actividad se ve restringida ante determinadas especies o variedades cultivo, ante diferentes tipos de suelo e incluso frente a cepas específicas del patógeno, dada la diversidad genética que algunos de ellos presentan (*i. e.*, *Ralstonia solanacearum*) (Jackson, 2009). Además, aún es escaso el conocimiento que existe sobre el efecto que ejercen los agentes de control biológico sobre la microbiota asociada a la raíz y, por ende, sobre la planta. Los estudios del microbioma son, por tanto, esenciales para determinar la naturaleza de dichas interacciones y, así, desarrollar productos de biocontrol eficaces ante diferentes condiciones.

Previamente a la aparición de las técnicas de secuenciación masiva u ómica, los estudios sobre

la estructura de las comunidades microbianas se realizaban mediante técnicas convencionales de conteo, con el uso de medios específicos de cultivo (Tan et al., 2006). Si bien solo el 1 % de los organismos presentes en el suelo o asociados a las plantas son cultivables en la actualidad (Bakken, 1997), las técnicas independientes de cultivo son estrictamente necesarias para tener una visión más representativa de las comunidades microbianas.

Las técnicas de huella genética —electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, por su sigla en inglés) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por su sigla en inglés)— han demostrado ser muy útiles en los estudios del microbioma. Gracias a ellas, se ha podido demostrar la capacidad del agente de biocontrol para establecerse en la rizosfera (rizocompetencia), sus habilidades antagonistas y su extraordinario impacto sobre las comunidades microbianas presentes, asimismo se ha logrado evidenciar el destino de un agente patógeno en respuesta a la presencia del antagonista. No obstante, estas técnicas tienen algunas limitaciones, ya que solo determinan la presencia de las poblaciones más abundantes (> 1 %) (Muyzer & Smalla, 1998). Ahora bien, si es posible identificar poblaciones concretas de organismos mediante la escisión de la banda pertinente y su posterior clonado y secuenciado, logísticamente no se puede identificar a la comunidad en su conjunto. Es por esta razón que las técnicas ómicas y las de secuenciación de nueva generación, al tener este poder, abren la puerta a una nueva era que da la oportunidad de conocer con mayor profundidad e identificar en mayor medida los grupos de microorganismos presentes, la forma como interactúan entre ellos y las funciones que cumplen en el microuniverso del suelo.

Ralstonia solanacearum

Ralstonia solanacearum (*Rs*), la pesadilla de las solanáceas, produce la marchitez bacteriana o pudrición parda, enfermedad infecciosa que afecta diversos cultivos de gran importancia económica (Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta, & Nishiuchi, 1995). Dicha enfermedad es más severa en zonas tropicales o subtropicales, aunque también existen variantes

del patógeno que se han adaptado a temperaturas templadas (Cellier & Prior, 2010). La bacteria invade la raíz de la planta hasta llegar al xilema, donde se propaga bloqueando los haces vasculares, lo que se traduce en síntomas de marchitez y, en su estado más avanzado, en la muerte de la planta (Jackson, 2009).

Este patógeno tiene un amplio rango de huéspedes y es capaz de infectar 44 familias diferentes de plantas (Hayward, 1991). Esta característica, junto con otras como su capacidad para colonizar arvenses (hospederos intermediarios) y su habilidad para sobrevivir por largos periodos de tiempo tanto en hábitats terrestres (Grey & Steck, 2001) como acuáticos (Van Elsas, Kastelein, De Vries, & Van Overbeek, 2001), muchas veces en un estado de latencia no cultivable (Caitilyn, Prior, & Hayward, 2005), hacen de *Ralstonia* un patógeno especialmente difícil de erradicar. De hecho, la raza 3 de *Rs* (que incluye cepas que atacan la papa, el tomate y el geranio) es considerada un patógeno de cuarentena a nivel mundial y, en Estados Unidos, es considerada como patógeno de interés en agrobioterrorismo (Jackson, 2009; Swanson, Yao, Tans-Kersten, & Allen, 2005). Debido a tales características, la mayoría de los intentos por contrarrestar esta enfermedad no han sido completamente satisfactorios. Gran parte de dichos intentos se han focalizado en la búsqueda de plantas resistentes (Bhatti et al., 2011), en diferentes estrategias de cultivo (rotación de cultivos y uso de compost, entre otros), en el uso de antibacterianos (estreptomycin) y de microorganismos biocontroladores (Nion & Toyota, 2015).

El uso de agentes de biocontrol y de otras estrategias para lograr suelos supresivos frente a dicho patógeno se presenta como una alternativa plausible, a la vez que respetuosa con el medioambiente. En el caso de *Rs*, se han realizado numerosos estudios en las últimas décadas con el fin de encontrar potenciales biocontroladores para contrarrestarlo. La mayoría de los estudios se basan en la selección de antagonistas naturales mediante la realización de un tamizaje previo (con pruebas de antagonismo *in vitro*), para luego probar su eficacia *in vivo* con ensayos en invernadero (Aliye, Fininsa, & Hiskias, 2008; Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010; Ramesh, Joshi, & Ghanekar, 2009) y en campo (Guo et al., 2004; Hu, Li, & He, 2010).

El uso de cepas no virulentas por conversión fenotípica *in vitro* también ha resultado ser efectivo en ensayos de invernadero (Nakahara, Mori, Sadakari, Matsusaki, & Matsuzoe, 2016). Por otra parte, Götz et al. (2006) demostraron que la eficacia de los agentes de biocontrol no dependía solo de su capacidad antagonista frente al patógeno, sino también de otros aspectos fisiológicos. Uno de ellos, bastante importante, es la habilidad para colonizar la rizosfera o rizocompetencia, factor clave para hacer frente a los patógenos de la raíz (Lugtenberg et al., 2002), ya que para desplazar al patógeno o provocar cambios en el microbioma de la rizosfera es necesario antes colonizarla. En consecuencia, además de seleccionar agentes de biocontrol que sean rizocompetentes, es necesario determinar qué métodos de inoculación son los más adecuados para que estos microorganismos se establezcan con éxito en la rizosfera o en las partes de la planta que se desean tratar. Para conocer la capacidad rizocompetente, los ensayos realizados no solo se focalizaron en determinar la presencia del antagonista mediante técnicas de cultivo *in vitro* (conteo de bacterias), sino también en el uso de técnicas independientes de cultivo. De esta forma, se revelaron los patrones de colonización (GFP-CSLM, *green fluorescent protein aided confocal laser scanning microscope*), así como la capacidad del antagonista para establecerse en la rizosfera y modular su composición microbiana.

En el estudio de Götz et al. (2006), gracias a la combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo, se pudo comprobar la capacidad rizocompetente de dos cepas antagonistas de *Rs* (*Pseudomonas putida* PRD16 y *Enterobacter cowanii* PRF116) en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. Money-maker) y la eficacia del tipo de inoculación. En las huellas moleculares obtenidas por DGGE, que muestran la estructura de la comunidad microbiana estudiada, se pudo apreciar claramente en el primer muestreo (ocho días tras la inoculación de las semillas) las bandas o ribotipos que corresponden a los antagonistas, las cuales se hicieron muy débiles o llegaron a desaparecer en los muestreos posteriores.

No obstante, cuando las bacterias fueron inoculadas en la raíz, la bacteria antagonista *P. putida* presentó un mayor número de unidades formadoras de colonia (UFC) en la rizosfera, además de causar fuertes cambios

estructurales en las comunidades de *Pseudomonas spp.* y de betaproteobacterias. En general, este estudio demostró que el tipo de inoculación afecta el proceso de colonización de la raíz llevado a cabo por las bacterias: son más adecuadas las inoculaciones en la raíz que las realizadas en semillas (presemebrado). Existen otros estudios en los que el antagonista (*Ralstonia pickettii* QL-A6) se inoculó directamente en el tallo (10^5 UFC), con lo cual se logró reducir la incidencia de la enfermedad en un 71 %, frente al 53 % que se obtuvo cuando el antagonista fue inoculado en el suelo (10^9 UFC) (Wei et al., 2013).

Xue et al. (2009) también demostraron la capacidad de una cepa antagonista para colonizar eficientemente la rizosfera de tomate, la cual fue detectada por DGGE incluso 27 días después de su última inoculación, tiempo en el cual provocó fuertes cambios en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizosfera. La cepa bacteriana XY21 de *Serratia marcescens* fue seleccionada como potencial agente de biocontrol de *Rs* por presentar una alta capacidad de colonización *in planta*, aun cuando su actividad antagonista *in vitro* frente a diferentes cepas de *Rs* fue variable. Esto también se demostró en otros estudios en los que, a pesar de que algunos de los aislamientos no presentaron *a priori* actividad antibacteriana *in vitro*, sí demostraron la capacidad de controlar el marchitamiento en ensayos de invernadero (Nakahara et al., 2016).

La cepa bacteriana XY21 demostró ser efectiva frente a dos cepas diferentes del patógeno *Rs* en ensayos de campo, incluso cuando fue aplicada en diferentes ambientes (dos localidades) y en diferentes tipos de cultivo (pimentón y tomate). Sin embargo, la actividad biocontroladora de *S. marcescens* en ensayos de invernadero frente a diferentes cepas de *Rs* fue variable (entre 19,5 % y 70,3 %), probablemente debido a la gran diversidad y plasticidad genética de *Ralstonia* (Jackson, 2009; Grover et al., 2006; Xue et al., 2009). Otros estudios de las comunidades microbianas también señalan fuertes cambios en la estructura de estas en respuesta a la adición de compost, gracias a lo cual se genera una disminución de *Rs*, además del establecimiento en la rizosfera de algunas bacterias dominantes relacionadas tales como *Variovorax paradoxus* y *Aquaspirillum psychrophilum*, presentes en el compost previamente a su adición (Schönfeld et al., 2003).

Estos ensayos demuestran la importancia de los estudios del microbioma, ya que el agente inoculado puede promover cambios en la composición de la microbiota de la rizosfera, cambios que, a su vez, definen la permanencia o la considerable disminución del fitopatógeno. De hecho, existen estudios que señalan que la capacidad de invasión y supervivencia del patógeno se ve reducida en ambientes con una alta diversidad microbiana (Van Elsas et al., 2012), aunque estudios previos realizados por Messiha et al. (2009, 2007) señalan que la alta diversidad bacteriana propicia en algunos casos una menor eficiencia del agente de biocontrol: en suelos con baja diversidad bacteriana, la abundancia del patógeno se ve disminuida rápidamente, posiblemente debido a que el antagonista presenta mayor rizocompetencia. Sucede lo contrario cuando el inóculo es aplicado en suelos agrícolas orgánicos, con una riqueza bacteriana mayor, en los cuales las tasas de disminución del patógeno y, por ende, el control de la enfermedad pueden ser menores, debido a una menor rizocompetencia del antagonista

Estudios realizados para evaluar la eficacia de la inoculación de plantas de tomate con diversos consorcios microbianos y en diferente concentración frente a *Rs* mostraron que el número de bacterias del consorcio estuvo correlacionado negativamente con el número de plantas en estado de marchitez (Irikiin, Nishiyama, Otsuka, & Senoo, 2006). Además, se encontró que si las combinaciones de bacterias inoculadas de este consorcio eran capaces de metabolizar un mayor espectro de fuentes de carbono, esto se correlacionaba con un retardo en el proceso de la marchitez (Irikiin et al., 2006). Lo anterior indica que probablemente comunidades con un espectro metabólico más amplio tendrían menor solapamiento de nicho (nicho por competencia de recursos) y que, al mismo tiempo, al cubrir un amplio rango metabólico, probablemente el nicho de alguna de las cepas se solaparía con el del patógeno, lo cual impediría que este colonice la raíz.

Wei et al. (2015) realizaron un estudio sobre las redes tróficas y la diversidad bacteriana en relación con la capacidad invasiva de *Rs*, y demostraron que al enfrentar con el patógeno diferentes combinaciones de cepas no virulentas de *R. solanacearum*, en ensayos *in vitro* y en invernadero, los modelos de redes tróficas

resultaron tener una mejor capacidad de predicción que los basados en la diversidad en los ensayos desarrollados en microcosmos. No obstante, en los ensayos *ad planta*, una alta diversidad microbiana estuvo directamente correlacionada con una mayor resistencia a la invasión del patógeno. De igual manera, la estructura de las redes tróficas también permitió predecir la capacidad invasiva de *Rs*. En dicha estructura, una alta conectividad y un bajo anidamiento de las comunidades residentes estuvieron asociados con una resistencia a la capacidad invasiva del patógeno. Por otra parte, comunidades muy anidadas fueron más vulnerables a la invasión y dispersión del patógeno, quizás porque estas presentaron una menor estabilidad. Wei et al. (2015) también sugieren que la relación entre una alta diversidad y una menor capacidad invasiva del patógeno puede estar condicionada por una mayor capacidad rizocompetente de las bacterias biocontroladoras o por la inducción de resistencia sistémica en la planta.

Estudios recientes realizados por Elsayed, Nour, Jacquioud, Sørensen y Smalla (2017), quienes incorporaron las ciencias ómicas como herramienta para investigar el efecto de los agentes de biocontrol sobre la composición de las comunidades microbianas en la rizosfera y su efectividad frente al patógeno *Rs*, utilizaron endófitos como potenciales agentes de biocontrol para combatir la marchitez bacteriana en estudios *ad planta* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Money-maker). En este estudio, se realizó un pretratamiento de semillas y un tratamiento de las plántulas con antagonistas (STEN-215 *Pseudomonas helmanticensis*, DS2EC-299 *Pseudomonas koreensis*, AL2YTEN-142 *Pseudomonas brassicacearum*, B63 *Bacillus vallismortis* y B74 *Pseudomonas chlororaphis*) antes de su transferencia a suelo conductivo. En esta experiencia —al igual que en el estudio de Götz et al. (2006)— resultó ser más efectiva la inoculación del antagonista directamente en la raíz (cuando se aplicó en esta una suspensión bacteriana) que el tratamiento único de semillas, lo cual demuestra, una vez más, que el tipo de inoculación define en gran medida la eficacia del antagonista.

Dos de las cepas estudiadas (B63 *B. vallismortis* y AL2YTEN-142 *P. brassicacearum*) presentaron una mayor eficacia en el control biológico de *Ralstonia* (figura 4.4): solo el 20 % de las plantas tratadas

con estas presentaron síntomas de marchitamiento, frente a un 59 % de las que fueron tratadas con otras cepas. Los análisis realizados con microscopía confocal de barrido por láser (CLSM) confirmaron,

además, la presencia de la cepa AL2YTEN-142 *P. brassicacearum* (marcada con *green fluorescent protein* o GFP) en la raíz e incluso en el xilema, lo cual demostró su característica endofítica (figura 4.5).

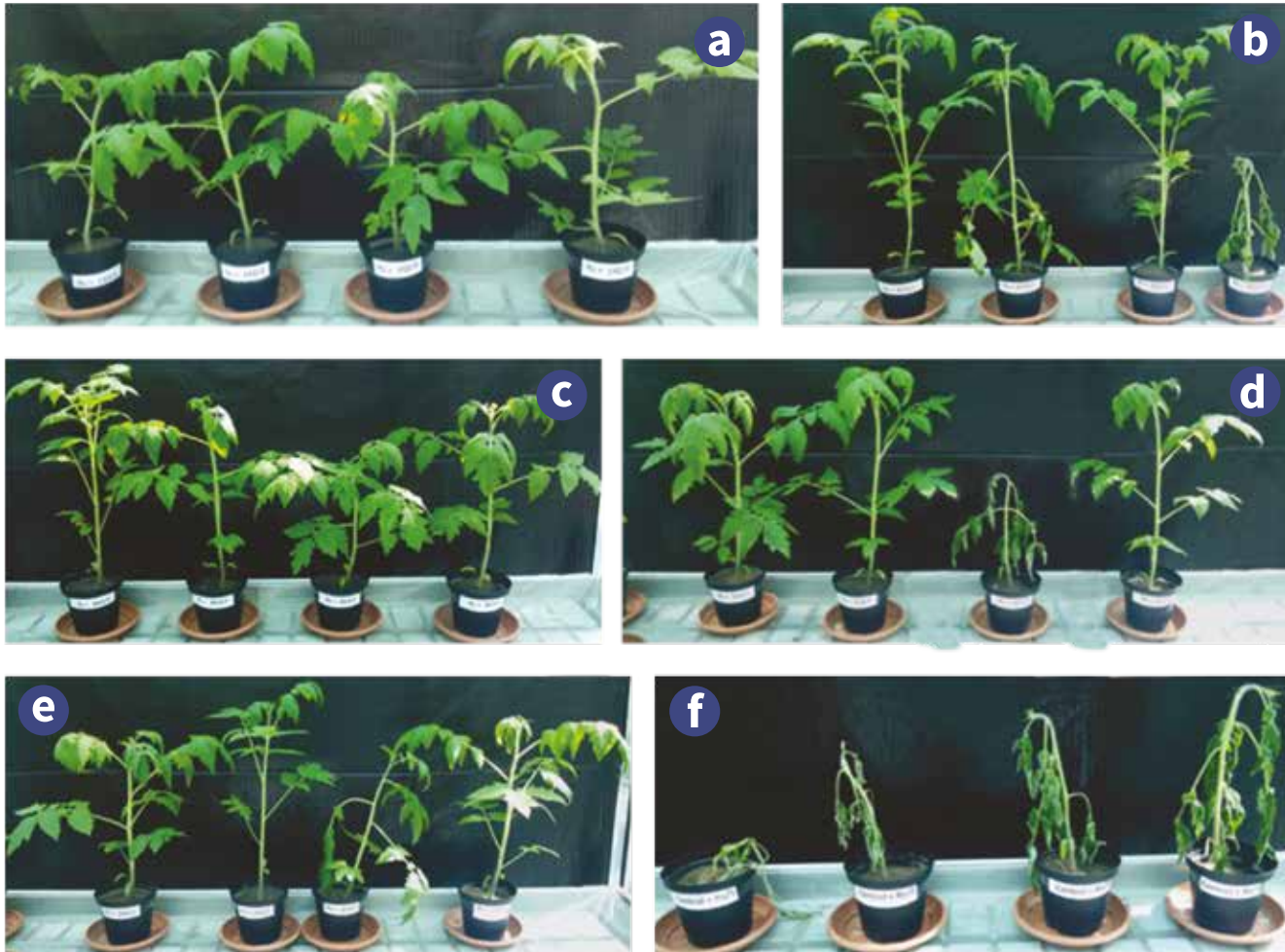


Foto: Tarek Sayed Ragab Elsayed

Figura 4.4. Síntomas de marchitamiento en plantas de tomate, 14 días después de ser infectadas con el patógeno. Plantas tratadas con los antagonistas: a. AL2YTEN-142 *P. brassicacearum*; b. B74 *P. chlororaphis*; c. B63 *B. vallismortis*; d. STEN-215 *P. helmanticensis*; e. DS2EC-299 *P. koreensis*; f. Plantas control infectadas con el patógeno *Ralstonia solanacearum* 1,7810⁶ UFC/g suelo.

Los análisis de secuenciación (16s rRNA gene) revelaron fuertes cambios en la comunidad bacteriana de la rizosfera en respuesta a la infección con *Ralstonia*, lo cual tuvo lugar con una disminución de la diversidad bacteriana. Asimismo, las plantas tratadas con los dos antagonistas mencionados presentaron una reducción clara del patógeno en la rizosfera (0,1%), datos que están correlacionados con la carencia de síntomas en las plantas. Los dos antagonistas provocaron fuertes cambios en las comunidades bacterianas nativas, así como aumentos de la abundancia relativa de géneros de bacterias que podrían estar

asociadas con actividades de biocontrol (*Arthrobacter*) y de promoción del crecimiento (*Sphingomonas*).

Lo anterior demuestra que tanto la concentración del inóculo de los agentes de control biológico como la forma de aplicación y los cambios en la estructura del microbioma que estos provocan están relacionados con su efectividad. De este modo, se confirma que los estudios de biocontrol deben orientarse hacia la creación de comunidades microbianas que limiten o que no permitan la invasión del patógeno, para lo cual, los estudios del microbioma son indispensables.

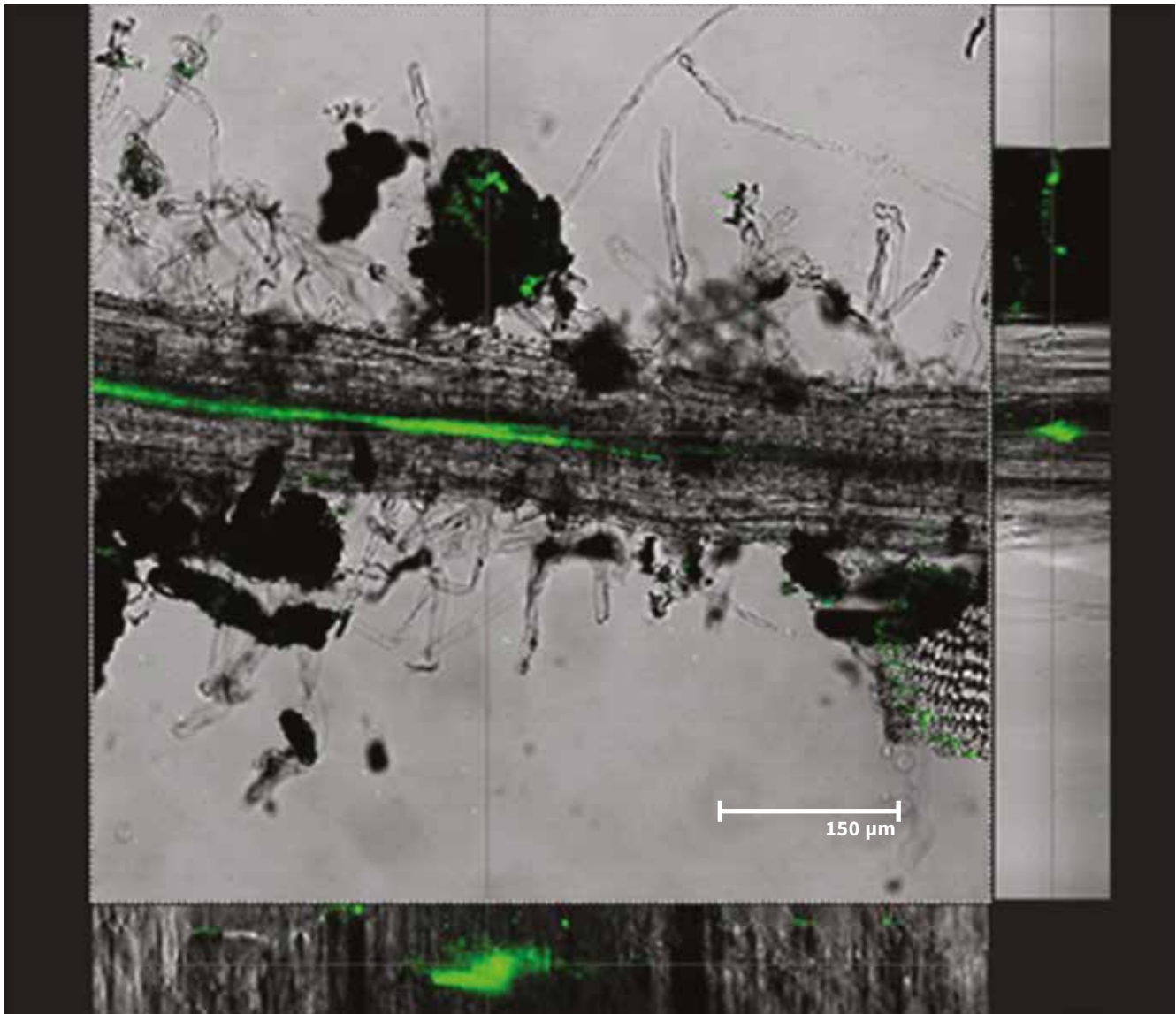


Foto: Tarek Tarek Sayed Ragab Elsayed

Figura 4.5. CLSM de la raíz de la planta del tomate infectada con *Ralstonia solanacearum*. *Ralstonia* se propaga en el sistema vascular de la planta, donde produce sustancias poliméricas extracelulares que terminan colapsando el xilema e impidiendo su buen funcionamiento, lo que produce el marchitamiento de la planta y finalmente su muerte.

Suelos supresivos como una fuente de microorganismos para el control de *Fusarium oxysporum* en uchuva

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es una fruta perteneciente a la familia de las solanáceas. El género al que pertenece cuenta con más de ochenta especies que se encuentran en estado silvestre y se caracterizan porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o capacho. *P. peruviana* es la especie más conocida de este género y se caracteriza por tener un fruto azucarado y un buen contenido de vitaminas A y C,

además de hierro y fósforo (Corporación Colombia Internacional, 2007). Es originaria de los Andes y se cultiva principalmente en Perú, Ecuador y Colombia. Debido a la demanda de esta fruta en los mercados internacionales, su cultivo se ha extendido a otros países del continente (p. ej., Chile y Brasil) y de otros continentes (India, Zimbabue, Kenia, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica) (Fischer, Almanza-

Merchán, & Miranda, 2014). En Colombia, los principales departamentos con mayor producción de uchuva son Boyacá, Cundinamarca, Antioquia y Nariño (Arias, Gómez, Suárez, & Rendón, 2015), los cuales han logrado posicionarla como uno de los frutos frescos de exportación más importantes del mercado nacional, con los que se han obtenido cerca de 23,5 millones de dólares en exportaciones durante el periodo de enero a diciembre de 2015 (Redacción Economía, 2016).

Una de las principales dificultades del cultivo de la uchuva es la presencia del hongo *Fusarium oxysporum*, agente causal del marchitamiento vascular (Fischer et al., 2014; González & Barrero, 2011), que ha llevado a la disminución de la producción en las regiones de Cundinamarca, Boyacá (Fischer et al., 2014; González & Barrero, 2011) y Antioquia, con pérdidas de más del 50 % (Smith 2012). Esta enfermedad se manifiesta con la obstrucción de los haces vasculares, lo cual se traduce en la pérdida de turgencia de las hojas, debilitamiento y clorosis, que llevan a la muerte total de las plantas (Armstrong & Armstrong, 1981; Balaguera, Ramírez, & Herrera, 2014; González & Barrero, 2011; Obregón, Lancharos, Forero de La-Rotta, Miranda, & Chávez, 2007). La principal limitante para el control de esta enfermedad es la presencia del patógeno en el suelo o en los residuos de las cosechas infectadas, así como su persistencia en suelo debido a su capacidad de formar esporas de resistencia o clamidosporas (Michielse & Rep, 2009; Zacky & Ting, 2013), las cuales germinan al entrar en contacto con exudados de las raíces de las plantas hospederas (Haglund & Kraft, 2001). Además, este hongo presenta una gran versatilidad fisiológica, lo que lo hace un microorganismo cosmopolita (Beckman, 1987; Gordon & Martyn, 1997).

Dentro de los métodos de control, se ha utilizado la rotación de cultivos, que no ha sido completamente efectiva debido a que las clamidosporas sobreviven mucho tiempo en el suelo. Se ha usado la fumigación del suelo, que suministra una buena intervención inicial, pero la recolonización aparece muy rápidamente. El uso de compost o compost enriquecido con microorganismos seleccionados también ha sido utilizado, pero infortunadamente, en muchos casos, sin resultados satisfactorios (Garibaldi, Gilardi, & Gullino, 2004; Pera & Calvet,

1989; Szczech, Rondonański, Brzeski, Smolińska, & Kotowski, 1993). Así, pues, encontrar estrategias que muestren efectividad y reproducibilidad para el control de este patógeno, y que sean de fácil adopción por los agricultores, es uno de los grandes retos en la investigación agrícola del cultivo de uchuva en Colombia.

Una de las posibles alternativas para el control de *F. oxysporum* es la búsqueda de suelos que por sus características biológicas o no biológicas eviten el desarrollo de la enfermedad: suelos supresivos. En el caso del control biológico, la identificación de suelos supresivos puede guiar la búsqueda de potenciales organismos o comunidades controladoras. Estrategias como esta han generado resultados promisorios en otros patosistemas, por ejemplo, en cultivos de *Musa acuminata*, en cuyos suelos con potencial de supresividad se logró reducir la población de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en un 86 % (Shen et al., 2015); y también, más recientemente, en cultivos de *Lycopersicon esculentum* cv. Chourouk, gracias a cuyos suelos se logró controlar la incidencia del marchitamiento producido por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Kouki et al., 2012).

El primer paso para el estudio de este tipo de suelos fue identificar aquellas regiones o zonas geográficas donde se observaba el fenómeno de supresividad. Estudios realizados por Corpoica identificaron varias regiones en el sur del país (Nariño) donde la incidencia de los síntomas en uchuva asociados a *F. oxysporum* fue más baja que la observada en otras zonas del país. Estos suelos con menor incidencia fueron, entonces, una interesante alternativa para identificar las razones bióticas y abióticas implicadas en reducir la incidencia del patógeno, y fueron también un punto de partida para intentar replicar este fenómeno de supresividad en otras regiones del país.

Para aprovechar este fenómeno e identificar y propagar las comunidades supresivas en la raíz (ya que el rizobioma es la primera línea de defensa para controlar el desarrollo de la enfermedad), en Corpoica se realizaron estudios iniciales que permitieron el análisis del microbioma de la raíz y del suelo circundante. En dichos estudios se encontró (mediante el uso del marcador 16SrRNA) que las comunidades de bacterias asociadas a las raíces de

plantas de uchuva en distintas localidades de Nariño estaban enriquecidas con organismos cercanamente relacionados con las bacterias del filo Actinobacteria, 34 % frente a 14 % en suelo circundante (figura 4.2), mientras que los suelos circundantes presentaban un mayor número de bacterias del filo Acidobacteria 17 % frente a 7 % en rizosfera.

Por otra parte, reportes previos en remolacha han encontrado una asociación de la supresividad con la presencia de actinobacterias, comunidades supresivas enriquecidas en los mismos grupos taxonómicos (Mendes et al., 2011). Esta información llevó a varias alternativas interesantes que permitieron reproducir

estas comunidades microbianas en otros suelos. Una de ellas fue mediante el trasplante de microbioma, mezclando el suelo conductivo con un 10 % del suelo supresivo. También se aislaron de forma dirigida grupos presentes en la rizosfera y se evaluaron en consorcios de 5 o 10 microorganismos, algunos de los cuales han logrado hasta el momento reducir la incidencia de la enfermedad.

Ambos trabajos se encuentran actualmente en desarrollo por el equipo de trabajo que realiza investigación sobre el control biológico de la marchitez vascular de la uchuva, en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA.



Conclusiones y perspectivas

El aislamiento de los microorganismos biocontroladores, así como las técnicas de tamizado o *screening* para determinar su potencial antagonista, dependieron en el pasado de técnicas de cultivo, que en muchos casos condujeron a la obtención de agentes de biocontrol exitosos. Sin embargo, en repetidas ocasiones, el control obtenido ha sido inconsistente, pues aún se desconoce cómo actúan realmente estos microorganismos cuando son aplicados en campo, dada la multiplicidad de interacciones que pueden tener con la planta, con el patógeno y con la comunidad microbiana asociada, sobre la cual hay un gran desconocimiento en cuanto a los factores que determinan el éxito.

Una de las vías para lograr mayores niveles de control y consistencia con los bioinsumos basados en microorganismos ha sido el uso de técnicas independientes de cultivo y de alto rendimiento, que permiten una rápida caracterización multiómica. Su utilización ha permitido demostrar el impacto de determinados agentes de biocontrol sobre la composición de la comunidad microbiana presente en el suelo o asociada a la planta, y obtener información más detallada sobre cómo responde el microbioma de la planta a la presencia del patógeno o a los de agentes de biocontrol.

Los estudios del microbioma de plantas son una pieza clave para el desarrollo de bioproductos o para la implementación de estrategias de control biológico, por varias razones: han permitido determinar el impacto de los agentes de biocontrol sobre la composición de la comunidad microbiana, han determinado la abundancia relativa del inóculo a lo largo del tiempo, han llevado al monitoreo de los procesos de competencia que ocurren en respuesta a la introducción de agentes exógenos en el sistema y han permitido conocer el impacto ambiental de la aplicación de agentes exógenos en medios naturales y sus posibles riesgos. Gracias a esto último, se han logrado determinar las posibles repercusiones de la aplicación de agentes de biocontrol a gran escala o a lo largo de extensos periodos de tiempo.

Contar hoy en día con genomas secuenciados de macro- y microorganismos, con colecciones de cultivo y con transcriptomas y metabolomas facilita el desarrollo de sistemas modelo de microbiomas de plantas, los cuales permitirán un mayor entendimiento de las interacciones planta-microbioma y la generación de una base de conocimientos necesaria para una agricultura sostenible.

Además de las propiedades genéticas del microbioma, es importante considerar un método y una estrategia de inoculación que aseguren el éxito de su ensamblaje. Los esfuerzos para maximizar la capacidad de colonización deben asegurar que las comunidades inoculadas no sean tan agresivas, al punto que invadan los ecosistemas locales y afecten negativamente la sanidad del suelo, las plantas vecinas o los cultivos futuros. Por esta razón, para cualquier manejo de microbiomas agrícolas, hay que tener en cuenta todos los factores abióticos (temperatura, luz, acidez, nutrientes y disponibilidad de agua) y bióticos (competencia, predación, parasitismo y mutualismo) que puedan influir.

Además de considerar los factores bióticos o abióticos a la hora de aplicar los estudios de microbioma para mejorar la salud y el rendimiento de los cultivos, es muy importante considerar los efectos de las interacciones entre el genotipo del hospedero y el ambiente, la capacidad competitiva en relación con la comunidad microbiana circundante y las prácticas de manejo. Es así como el conocimiento del microbioma de la planta se convierte en una pieza clave para el desarrollo de nuevas estrategias de control biológico, pues este es un componente fundamental del fitobioma (el cual está conformado por las plantas, su medioambiente y los macro- y microorganismos asociados —que interactúan a través de mecanismos de señalización—). El conocimiento integrado y la comprensión de estos mecanismos de señalización de cada uno de los miembros del fitobioma y de las redes que se originan entre ellos son en realidad la alternativa que conducirá a nuevas estrategias tanto de control como de mejoramiento de la sanidad vegetal y de la productividad agrícola.

Agradecimientos

Los autores agradecen al equipo de investigación de AGROSAVIA que trabaja sobre el control biológico de la marchitez vascular de uchuva; en especial, a Diana García, Cindy Nayibe Mejía y Lizeth Lorena Dávila, por sus contribuciones en el tema de suelos supresivos como fuente de microorganismos para el control de *Fusarium oxysporum*.

Referencias

- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S., & Schena, L. (2016). Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research*, 3, 16047. doi:10.1038/hortres.2016.47.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58(4), 921-929. doi:10.1007/s00248-009-9531-y.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biology*, 14(1), 1002352. doi:10.1371/journal.pbio.1002352.
- Alavi, P., Starcher, M. R., Thallinger, G. G., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics*, 15, 482. doi:10.1186/1471-2164-15-482.
- Alavi, P., Starcher, M. R., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2013). Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405(T). *Frontiers in Plant Science*, 4, 141. doi:10.3389/fpls.2013.00141.
- Alivisatos, A. P., Blaser, M. J., Brodie, E. L., Chun, M., Dangl, J. L., Donohue, T. J., ... Taha, S. A. (2015). A unified initiative to harness Earth's microbiomes. *Science* 350(6260), 507-508. doi:10.1126/science.aac8480.
- Aliye, N., Fininsa, C., & Hiskias, Y. (2008). Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, 47(3), 282-288. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.09.003.
- Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 603-635. doi:10.1146/annurev.py.30.090192.003131.
- Arias, F., Gómez, L., Suárez, E., & Rendón, S. (2015). Inteligencia de mercados para la cadena de uchuva colombiana (*Physalis peruviana*). *Revista Oidles*, 9(18). Recuperado de <http://www.eumed.net/rev/oidles/18/uchuva.html>.
- Armstrong, G., & Armstrong, J. K. (1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In P. E. Nelson, T. A. Toussoun, & R. J. Cook (Eds.), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy* (pp. 391-399). Pennsylvania: Penn State University Press.
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x.
- Bakken, L. R. (1997). Culturable and nonculturable bacteria in soil. En J. D. Van Elsas, J. T. Trevors, & E. M. H. Wellington (Eds.), *Modern soil microbiology* (pp. 47-61). Nueva York, EE. UU.: CRC Press.
- Bakker, M. G., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Weir, T. L., & Vivanco, J. M. (2012). Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant and Soil*, 360(1-2), 1-13. doi:10.1007/s11104-012-1361-x.
- Balaguera, L. H. E., Ramírez, L. V., & Herrera, A. (2014). Fisiología y bioquímica del fruto de uchuva (*Physalis peruviana* L.) durante la maduración y poscosecha. En C. P. Pássaro Carvalho & D. A. Moreno (Eds.), *Physalis peruviana L.: fruta andina para el mundo* (pp. 113-131). Murcia, España: Cebas - csic.
- Barak, J. D., & Schroeder, B. K. (2012). Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 241-266. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172936.
- Barnard, R. L., Osborne, C. A., & Firestone, M. K. (2013). Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *The ISME Journal*, 7(11), 2229-2241. doi:10.1038/ismej.2013.104.
- Beckman, C. H. (1987). *The nature of wilt diseases of plants*. Maryland, EE. UU.: APS Press.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.

- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7.
- Berg, G., Eberl, L., & Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1673-1685. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x.
- Berg, G., Erlacher, A., Smalla, K., & Krause, R. (2014a). Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'? *Microbial Biotechnology*, 7(6), 487-495. doi:10.1111/1751-7915.12159.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014b). The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in Microbiology*, 5, 491. doi:10.3389/fmicb.2014.00491.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014c). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, 148. doi:10.3389/fmicb.2014.00148.
- Berg, G., Hartenberger, K., Liebming, S., & Zachow, C. (2012). Antagonistic endophytes from mistletoes as bioresource to control plant as well as clean room pathogens. *IOBC/WPRS Bulletin*, 78, 29-32. Recuperado de <https://goo.gl/QSKqM1>.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 995-1002. doi:10.1093/jxb/erv466.
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1-13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., & Tilcher, R. (2013). Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy*, 3(4), 648. doi:10.3390/agronomy3040648.
- Bernal, P. (10 de junio de 2016). Microbioma: el 'nuevo órgano' del cuerpo humano que compartimos con la mayoría de seres. *El Diario*. Recuperado de <https://goo.gl/xVVLRw>.
- Bhatti, K. H., Ahmed, N.-u.-D., Shah, A., Iqbal, M., Iqbal, T., & Jiahe, W. (2011). Transgenic tobacco with rice zinc-finger gene OsLOL2 exhibits an enhanced resistance against bacterial-wilt. *Australasian Plant Pathology*, 40(2), 133-140. doi:10.1007/s13313-010-0022-x.
- Blaser, M., Bork, P., Fraser, C., Knight, R., & Wang, J. (2013). The microbiome explored: recent insights and future challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 213-217. doi:10.1038/nrmicro2973.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 343-350. doi:10.1016/S1369-5266(00)00183-7.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., ... Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91-95. doi:10.1038/nature11336.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807-838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- Busby, P. E., Peay, K. G., & Newcombe, G. (2016). Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsora* rust disease severity. *New Phytologist*, 209(4), 1681-1692. doi:10.1111/nph.13742.
- Busby, P. E., Soman, C., Wagner, M. R., Friesen, M. L., Kremer, J., Bennett, A., ... Dangl, J. L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS Biology*, 15(3), e2001793. doi:10.1371/journal.pbio.2001793.
- Caitilyn, A., Prior, P., & Hayward, A. C. (Eds.). (2005). *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Saint Paul, EE. UU.: American Phytopathological Society.
- Camatti-Sartori, V., Da Silva-Ribeiro, R. T., Valdebenito-Sanhueza, R. M., Pagnocca, F. C., Echeverrigaray, S., & Azevedo, J. L. (2005). Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 397-402. doi:10.1002/jobm.200410547.
- Cardenas, P. A., Cooper, P. J., Cox, M. J., Chico, M., Arias, C., Moffatt, M. F., & Cookson, W. O. (2012). Upper airways microbiota in antibiotic-naïve wheezing and healthy infants from the tropics of rural Ecuador. *PLoS One*, 7(10), e46803. doi:10.1371/journal.pone.0046803.
- Cellier, G., & Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100(11), 1250-1261. doi:10.1094/PHYTO-02-10-0059.
- Cook, R. J. (2007). Tell me again what it is that you do. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 1-23. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094415.
- Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2015). Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 28(3), 274-285. doi:10.1094/MPMI-10-14-0331-FI.
- Corporación Colombia Internacional. (2007). *Sistema de inteligencia de mercados* (Perfil producto N°. 34).

- Recuperado de http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/5287/2/2006327162612_uchuva_CCI_actualizaci%C3%B3n.pdf.
- Darwin, C. (2010). Chapter I. Domestic dogs and cats. En *The variation of animals and plants under domestication* (pp. 15-48). Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511709500.
- DeAngelis, K. M., Pold, G., Topçuoğlu, B. D., Van Diepen, L. T. A., Varney, R. M., Blanchard, J. L., ... Frey, S. D. (2015). Long-term forest soil warming alters microbial communities in temperate forest soils. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00104.
- De Carvalho, M. P., Gulotta, G., Do Amaral, M. W., Lünsdorf, H., Sasse, F., & Abraham, W.-R. (2016). Coprinuslactone protects the edible mushroom *Coprinus comatus* against biofilm infections by blocking both quorum-sensing and MurA. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4254-4264. doi:10.1111/1462-2920.13560.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(26), 11971-11975. doi:10.1073/pnas.1002601107.
- Doornbos, R. F., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227-243. doi:10.1007/s13593-011-0028-y.
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T., ... Lugtenberg, B. (2011). Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and Fertility Soils*, 47(2), 197-205. doi:10.1007/s00374-010-0523-3.
- Elsayed, T. R., Nour, E. H., Jacquioid, S., Sørensen, S. J., & Smalla, K. (en prensa). Deciphering the complex interaction between *Ralstonia solanacearum* and antagonists during tomato wilt biocontrol: rhizosphere microbiome shifts as mode of action? *Frontiers in Microbiology*.
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., ... Smith, J.E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10(12), 1135-1142. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x.
- Fischer, G., Almanza-Merchán, P. J., & Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 01-15. doi:10.1590/0100-2945-441/13.
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., Von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martínez-Romero, E. (2011). Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42, 23-46. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039.
- Fungal Barcoding. (2017). *Fungal Barcoding Database*. Recuperado de <http://www.fungalbarcoding.org>.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., & Gullino, M. L. (2004). First report of *Fusarium oxysporum* causing vascular wilt of lamb's lettuce (*Valerianella olitoria*) in Italy. *Plant Disease*, 88(1), 83-83. doi:10.1094/PDIS.2004.88.1.83C.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., & Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biololy*, 12, 69. doi:10.1186/s12915-014-0069-1.
- Gilbert, J. A., Meyer, F., Jansson, J., Gordon, J., Pace, N., Tiedje, ... Knight, R. (2010). The earth microbiome project: Meeting report of the "1st EMP meeting on sample selection and acquisition" at Argonne National Laboratory October 6(th) 2010. *Standards in Genomic Sciences* 3(3), 249-253. doi:10.4056/aigs.1443528.
- González, C., & Barrero, M. (Eds.). (2011). *Estudio de la marchitez vascular de la uchuva para el mejoramiento genético del cultivo*. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) y Cámara de Comercio de Bogotá.
- Google Académico. (s. f.). *Estadísticas*. Recuperado de https://scholar.google.com/citations?view_op=metrics_intro&hl=es#d=gs_hdr_drw&p=&u=.
- Gordon, T. R., & Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 111-128. doi:10.1146/annurev.phyto.35.1.111.
- Götz, M., Gomes, N. C. M., Dratwinski, A., Costa, R., Berg, G., Peixoto, ... Smalla, K. (2006). Survival of GFP-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 207-218. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00093.x.
- Grey, B. E., & Steck, T. R. (2001). The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3866-3872. doi:10.1128/AEM.67.9.3866-3872.2001.
- Grover, A., Azmi, W., Gadewar, A. V., Pattanayak, D., Naik, P. S., Shekhawat, G. S., & Chakrabarti, S. K. (2006). Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 798-806. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02974.x.
- Grube, M., Cardinale, M., De Castro, J. V., Jr., Müller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME journal*, 3(9), 1105. doi:10.1038/ismej.2009.63.

- Guo, J.-H., Qi, H.-Y., Guo, Y.-H., Ge, H.-L., Gong, L.-Y., Zhang, L.-X., & Sun, P.-H. (2004). Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29(1), 66-72. doi:10.1016/S1049-9644(03)00124-5.
- Haglund, W., & Kraft, J. (2001). Fusarium wilt. In J. M. Kraft, & F. L. Pflieger (Eds.), *Compendium of pea diseases and pests* (pp. 13-14). Saint Paul, EE. UU.: APS Press.
- Haichar, F. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., ... Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12), 1221-1230.
- Haiser, H. J., Gootenberg, D. B., Chatman, K., Sirasani, G., Balskus, E. P., & Turnbaugh, P. J. (2013). Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science*, 341(6143), 295-298. doi:10.1126/science.1235872.
- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312(1-2), 7-14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z.
- Hashem, M., Alamri, S. A., Hesham, A. E.-L., Al-Qahtani, F. M. H., & Kilany, M. (2014). Biocontrol of apple blue mould by new yeast strains: *Cryptococcus albidus* KKUY0017 and *Wickerhamomyces anomalus* KKUY0051 and their mode of action. *Biocontrol Science and Technology*, 24(10), 1137-1152. doi:10.1080/09583157.2014.926857.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 65-87. doi:10.1146/annurev.py.29.090191.000433.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., & Hedges, S. B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science*, 293(5532), 1129-1133. doi:10.1126/science.1061457.
- Holden, N., Pritchard, L., & Toth, I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiology Review*, 33(4), 689-703. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00153.x.
- Hu, H. Q., Li, X. S., & He, H. (2010). Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of Capsicum bacterial wilt. *Biological Control*, 54(3), 359-365. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.06.015.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214. doi:10.1038/nature11234.
- Irikiin, Y., Nishiyama, M., Otsuka, S., & Senoo, K. (2006). Rhizobacterial community-level, sole carbon source utilization pattern affects the delay in the bacterial wilt of tomato grown in rhizobacterial community model system. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 27-32. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.003.
- Jackson, R. W. (Ed.). (2009). *Plant pathogenic bacteria: Genomics and molecular biology*. Norfolk, Reino Unido: Caister Academic Press.
- Kaestli, M., Schmid, M., Mayo, M., Rothballer, M., Harrington, G., Richardson, L., ... Currie, B. J. (2012). Out of the ground: aerial and exotic habitats of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in grasses in Australia. *Environmental Microbiology*, 14(8), 2058-2070. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02671.x.
- Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), 13715-13720. doi:10.1073/pnas.1216057111.
- Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E. M., & Berg, G. (2011). Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS One*, 6(9), e24452. doi:10.1371/journal.pone.0024452.
- Köberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E. M., Bauer, R., & Berg, G. (2013). The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. *Frontiers in Microbiology*, 4, 400. doi:10.3389/fmicb.2013.00400.
- Kouki, S., Saidi, N., Ben Rajeb, A., Brahmi, M., Bellila, A., Fumio, M., ... Ouzari, H. (2012). Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* F. sp. *radicis-lycopersici* using mixture of vegetable and *Posidonia oceanica* compost. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012, 1-11. doi:10.1155/2012/239639.
- Leach, J. E., Triplett, L. R., Argueso, C. T., & Trivedi, P. (2017). Communication in the Phytobiome. *Cell*, 169(4), 587-596. doi:10.1016/j.cell.2017.04.025.
- Lebeis, S. L. (2015). Greater than the sum of their parts: characterizing plant microbiomes at the community-level. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 82-86. doi:10.1016/j.pbi.2015.02.004.
- Lebeis, S. L., Rott, M., Dangel, J. L., & Schulze-Lefert, P. (2012). Culturing a plant microbiome community at the cross-Rhodes. *New Phytologist*, 196(2), 341-344. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04336.x.
- Lehman, R., Cambardella, C., Stott, D., Acosta-Martinez, V., Manter, D., Buyer, J., ... Karlen, D. (2015). Understanding and enhancing soil biological health: The solution for reversing soil degradation. *Sustainability*, 7(1), 988-1027. doi:10.3390/su7010988.
- Leveau, J. H. J. (2007). The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 279-300. doi:10.1007/s10658-007-9186-9.

- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875-1883. doi:10.1128/aem.69.4.1875-1883.2003.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C., & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 373-383. doi:10.1023/A:1020596903142.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., ... Dangl, J. L. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature* 488, 86-90. doi:10.1038/nature11237.
- Lyte, M. (2013). Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: How bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathogens*, 9(11), e1003726. doi:10.1371/journal.ppat.1003726.
- Mann, C. (1991). Lynn Margulis: Science's unruly earth mother. *Science*, 252 (5004), 378-381. doi:10.1126/science.252.5004.378.
- Massart, S., Martínez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control*, 89, 98-108. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.06.003.
- Mendes, L. W., Kuramae, E. E., Navarrete, A. A., Van Veen, J. A., & Tsai, S. M. (2014). Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME Journal*, 8(8), 1577-1587. doi:10.1038/ismej.2014.17.
- Mendes, L. W., Tsai, S. M., Navarrete, A. A., De Hollander, M., Van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2015). Soil-borne microbiome: Linking diversity to function. *Microbial Ecology*, 70(1), 255-265. doi:10.1007/s00248-014-0559-2.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van der Voort, M., Schneider, J. H. M., ... Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100. doi:10.1126/science.1203980.
- Menzies, J. D. (1959). Occurrence and transfer of abiological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathology*, 49, 648-652.
- Messiha, N. A. S., Van Bruggen, A. H. C., Franz, E., Janse, J. D., Schoeman-Weerdesteijn, M. E., Termorshuizen, A. J., & Van Diepeningen, A. D. (2009). Effects of soil type, management type and soil amendments on the survival of the potato brown rot bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Applied Soil Ecology*, 43(2-3), 206-215. doi:10.1016/j.apsoil.2009.07.008.
- Messiha, N. A. S., Van Diepeningen, A. D., Farag, N. S., Abdallah, S. A., Janse, J. D., & Van Bruggen, A. H. C. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *European Journal of Plant Pathology*, 118(3), 211-225. doi:10.1007/s10658-007-9136-6.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
- Morriën, E., Hannula, S. E., Snoek, L. B., Helmsing, N. R., Zweers, H., de Hollander, M., ... Van der Putten, W. H. (2017). Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses. *Nature Communications*, 8, 14349. doi:10.1038/ncomms14349.
- Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015). Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends in Microbiology*, 23(10), 606-617. doi:10.1016/j.tim.2015.07.009.
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141. doi:10.1023/A:1000669317571.
- Nakahara, H., Mori, T., Sadakari, N., Matsusaki, H., & Matsuzoe, N. (2016). Selection of effective non-pathogenic *Ralstonia solanacearum* as biocontrol agents against bacterial wilt in eggplant. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(3), 119-124. doi:10.1007/s41348-016-0019-y.
- NCBI. (2017). *GenBank*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Nguyen, M. T., & Ranamukhaarachchi, S. L., (2010). Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 395-405. doi:10.4454/jpp.v92i2.183.
- Nion, Y. A., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environments*, 30(1), 1-11. doi:10.1264/jsme2.ME14144.
- Nogales, A., Nobre, T., Valadas, V., Ragonezi, C., Döring, M., Polidoros, A., Arnholdt- & Schmitt, B. (2016). Can functional hologenomics aid tackling current challenges in plant breeding? *Briefings in Functional Genomics*, 15(4), 288-297. doi:10.1093/bfpg/elv030.
- Obregón, D., Lancheros, O., Forero de La-Rotta, M. C., Miranda, D., & Chavez, B. (2007). Efecto de los tratamientos químicos y biológicos sobre el marchitamiento vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.), ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht. Ponencia presentada en 2.º Congreso Colombiano de Horticultura. Bogotá, Colombia.
- Ofek, M., Hadar, Y., & Minz, D. (2012). Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). *PLOS One*, 7(7), e40117. doi:10.1371/journal.pone.0040117.
- Opelt, K., Berg, C., & Berg, G. (2007). The bryophyte genus *Sphagnum* is a reservoir for powerful and extraordinary

- antagonists and potentially facultative human pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1), 38-53. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00323.x.
- Ortiz, N., Armada, E., Duque, E., Roldán, A., & Azcón, R. (2015). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology*, 174, 87-96. doi:10.1016/j.jplph.2014.08.019.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177.
- Panke-Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E., & Kao-Kniffin, J. (2015). Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *The ISME Journal*, 9(4), 980-989. doi:10.1038/ismej.2014.196.
- Pera, J., & Calvet, C. (1989). Suppression of *Fusarium* wilt of carnation in a composted pine bark and a composted olive pumice. *Plant Disease*, 73(8), 699-700. doi:10.1094/PD-73-0699.
- Philippot, L., Hallin, S., Börjesson, G., & Baggs, E. M. (2009). Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant and Soil*, 321, 61-81. doi:10.1007/s11104-008-9796-9.
- Phytobiomes (2016). *Phytobiomes: A roadmap for research and translation*. Recuperado de <https://goo.gl/haofjs>.
- Ramesh, R., Joshi, A. A., & Ghanekar, M. P. (2009). Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 47-55. doi:10.1007/s11274-008-9859-3.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., ... Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl. 1), 4680-4687. doi:10.1073/pnas.1002611107.
- Redacción Economía (4 de febrero de 2016). Frutas que ProColombia ofrecerá a los alemanes. *El Espectador*. Recuperado de <https://goo.gl/X5q4so>.
- Reid, A., & Greene, S. E. (2013). *How microbes can help feed the world*. Recuperado de <https://goo.gl/GpqqQD>.
- Reuveni, M., Sheglov, D., Sheglov, N., Ben-Arie, R., & Prusky, D. (2002). Sensitivity of red delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control. *European Journal of Plant Pathology*, 108(5), 421-427. doi:10.1023/A:1016063626633.
- Roder, A., Hoffmann, E., Hagemann, M., & Berg, G. (2005). Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 219-226. doi:10.1016/j.femsle.2004.12.005.
- Rout, M. E., & Southworth, D. (2013). The root microbiome influences scales from molecules to ecosystems: The unseen majority. *American Journal of Botany*, 100(9), 1689-1691. doi:10.3732/ajb.1300291.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., ... Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(7), 514-525. doi:10.1038/nrmicro2163.
- Santhanam, R., Luu, V. T., Weinhold, A., Goldberg, J., Oh, Y., & Baldwin, I. T. (2015). Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), E5013-E5020. doi:10.1073/pnas.1505765112.
- Scherwinski, K., Grosch, R., & Berg, G. (2008). Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 106-116. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00421.x.
- Schlaeppli, K., & Bulgarelli, D. (2014). The plant microbiome at work. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 28(3), 212-217. doi:10.1094/MPMI-10-14-0334-FI.
- Schmid, F., Moser, G., Müller, H., & Berg, G. (2011). Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: Organic farming benefits natural biocontrol agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2188-2191. doi:10.1128/aem.02187-10.
- Schönfeld, J., Gelsomino, A., Van Overbeek, L. S., Gorissen, A., Smalla, K., & Van Elsas, J. D. (2003). Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), 63-74. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01046.x.
- Selosse, M.-A., Bessis, A., & Pozo, M. J. (2014). Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. *Trends in Microbiology*, 22(11), 607-613. doi:10.1016/j.tim.2014.07.003.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria. *Cells in the Body. PLoS Biology*, 14(8), e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- Shen, Z., Ruan, Y., Xue, C., Zhong, S., Li, R., & Shen, Q. (2015). Soils naturally suppressive to banana *Fusarium* wilt disease harbor unique bacterial communities. *Plant and Soil*, 393(1), 21-33. doi:10.1007/s11104-015-2474-9.
- Singh, B. K., Bardgett, R. D., Smith, P., & Reay, D. S. (2010). Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(11), 779-790. doi:10.1038/nrmicro2439.
- Soman, C., Li, D., Wander, M. M., & Kent, A. D. (2017). Long-term fertilizer and crop-rotation treatments

- differentially affect soil bacterial community structure. *Plant and Soil*, 413(1-2), 145-159. doi:10.1007/s1104-016-3083-y.
- Stulberg, E., Fravel, D., Proctor, L. M., Murray, D. M., LoTempio, J., Chrisey, L., ... Records, A. (2016). An assessment of US microbiome research. *Nature Microbiology*, 1(1), 1-7. doi:10.1038/nmicrobiol.2015.15.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., & Allen, C. (2005). Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology*, 95(2), 136-143. doi:10.1094/PHTO-95-0136.
- Szczecz, M., Rondański, W., Brzeski, M. W., Smolińska, U., & Kotowski, J. F. (1993). Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root infecting pathogens of cabbage and tomato. *Biological Agriculture & Horticulture*, 10(1), 47-52. doi:10.1080/01448765.1993.9754650.
- Tan, H. M., Cao, L. X., He, Z. F., Su, G. J., Lin, B., & Zhou, S. N. (2006). Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1275-1280. doi:10.1007/s11274-006-9172-y.
- Tang, W. H. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., ... Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbial metabolism of Phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine*, 368(17), 1575-1584. doi:10.1056/NEJMoa1109400.
- Teplitski, M., Warriner, K., Bartz, J., & Schneider, K. R. (2011). Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiology*, 19(3), 121-127. doi:10.1016/j.tim.2010.11.007.
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., ... Bordenstein, S. R. (2016). Getting the hologenome concept right: an ecoevolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems*, 1(2), e00028-16. doi:10.1128/mSystems.00028-16.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One*, 7(7), e40863. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, 449(7164), 804-810. doi:10.1038/nature06244.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14(6), 209. doi:10.1186/gb-2013-14-6-209.
- Tyler, H. L., & Triplett, E. W. (2008). Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 53-73. doi:10.1146/annurev.phyto.011708.103102.
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., & Thomma, B. P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 239-277. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x.
- Van Elsas, J. D., Chiurazzi, M., Mallon, C. A., Elhottová, D., Křišťůfek, V., & Salles, J. F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1159-1164. doi:10.1073/pnas.1109326109.
- Van Elsas, J. D., Kastelein, P., De Vries, P. M., & Van Overbeek, L. S. (2001). Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9), 842-854. doi:10.1139/w01-084.
- Van Overbeek, L. S., Van Doorn, J., Wichers, J. H., Van Amerongen, A., Van Roermund, H. J., & Willemsen,

- P. T. (2014). The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, 104. doi:10.3389/fmicb.2014.00104.
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *The New Phytologist*, 206(4), 1196-1206. doi:10.1111/nph.13312.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(12), 828-840. doi:10.1038/nrmicro2910.
- Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Coleman-Derr, D., Tringe, S. G., Dangl, J. L., & Mitchell-Olds, T. (2014). Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Ecology Letters*, 17(6), 717-726. doi:10.1111/ele.12276.
- Wei, Z., Huang, J., Tan, S., Mei, X., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The congeneric strain *Ralstonia pickettii* QL-A6 of *Ralstonia solanacearum* as an effective biocontrol agent for bacterial wilt of tomato. *Biological Control*, 65(2), 278-285. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.12.010.
- Wei, Z., Yang, T., Friman, V.-P., Xu, Y., Shen, Q., & Jousset, A. (2015). Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nature Communications*, 6, 8413. doi:10.1038/ncomms9413.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40, 309-348. doi:10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578.
- Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., ... Soyer, O. S. (2016). Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*, 10(11), 2557-2568. doi:10.1038/ismej.2016.45.
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., & Schena, L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3-10. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.05.012.
- Wubs, E. R. J., Van der Putten, W. H., Bosch, M., & Bezemer, T. M. (2016). Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nature Plants*, 2(8), 16107. doi:10.1038/nplants.2016.107.
- Xue, Q.-Y., Chen, Y., Li, S.-M., Chen, L.-F., Ding, G.-C., Guo, D.-W., Guo, J.-H. (2009). Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48(3), 252-258. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.11.004.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. *Microbiology and Immunology*, 39(11), 897-904. doi:10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x.
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227. doi:10.1038/nature11053.
- Zachow, C., Berg, C., Müller, H., Meincke, R., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., ... Berg, G. (2009). Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *The ISME Journal*, 3(1), 79. doi:10.1038/ismej.2008.87.
- Zacky, F. A., & Ting, A. S. Y. (2013). Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4. *Biological Control*, 66(3), 204-208. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.06.001.