

Capítulo 20

Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos

Chapter 20

Novel strategies for plant pathogens biological control

Alba Marina Cotes,¹ Stephen Mosher,¹
Gloria Patricia Barrera,¹ Sadao Kobayashi,¹ Yigal Elad²

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

² Department of Plant Pathology and Weed Sciences,
ARO, The Volcani Center

Contenido

Introducción	882
Uso de consorcios microbianos en el control biológico	882
Bioplaguicidas con actividad biofertilizante y biorremediadora	884
Screening de alta eficiencia para el descubrimiento de nuevos agentes de control biológico	886
Screening a nivel orgánico	887
Screening al nivel de bioactividad	889
Consideraciones finales	890
Control biológico de virus de plantas	890
Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos	891
Endófitos	895
Bioestimulantes para mejorar la actividad de los microorganismos biocontroladores	896
Ácidos húmicos y fúlvicos	896
Hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen nitrógeno ...	896
Extractos de algas marinas y plantas	897
Quitina, quitosán y otros biopolímeros	898
Aplicaciones del microbioma presente en distintos tejidos de la planta	899
Elicitores	902
RNAi: nueva estrategia de control de fitopatógenos basada en silenciamiento génico	905
ARN de interferencia	905
Antecedentes	905
Funcionamiento	906
Aplicaciones	906
Consideraciones finales	908
Conclusiones y perspectivas	909
Referencias	910

Resumen

Las tecnologías biológicas, incluyendo el uso de microorganismos biocontroladores, están adquiriendo una importancia primordial en la producción agrícola. Sin embargo, la mayoría de los enfoques para el control biológico de enfermedades de las plantas ha tenido un alcance limitado. Un ejemplo de esto lo representa el hecho de que, en las últimas décadas, en general, se han utilizado agentes de biocontrol individuales para controlar un solo patógeno. Esto puede explicar parcialmente la respuesta inconsistente que se observa frecuentemente, ya que dichos agentes individuales pueden ser inactivos en varios de los ambientes en los que se aplican o contra diferentes patógenos que atacan a la planta huésped. Lograr un control de amplio espectro de patógenos por los antagonistas que se apliquen individualmente o en consorcio sigue siendo, en gran medida, un objetivo no cumplido para la explotación eficaz del control biológico, así como ampliar los usos de los agentes de control biológico para lograr efectos complementarios, tales como tolerancia a factores abióticos limitantes como la sequía y la salinidad, biofertilización y biorremediación, entre otros. Además, en general, se han usado los mismos microorganismos biocontroladores y los descubrimientos de nuevos agentes de control biológico son muy limitados. Sin embargo, estas investigaciones requieren de métodos de tamizado o *screening* de alta eficiencia que permitan evaluar de forma rápida muchos microorganismos. De otra parte, existen múltiples patógenos para los cuales no se han desarrollado alternativas de control biológico efectivas, como es el caso de muchas bacterias fitopatógenas y de virus, donde existe un potencial inexplorado. Así mismo, el desarrollo de nuevos componentes de manejo que puedan integrarse a los agentes de control biológico para mejorar la respuesta de control tiene aún mucho espacio de investigación.

Palabras clave

ARNi, bacteriófagos, bioestimulantes, biofertilización, bioplaguicidas, biorremediación, consorcios microbianos, elicitores, endófitos, *screening*, virus fitopatógenos

Abstract

Biological technologies, including the use of biocontrol microorganisms, are of primary importance in agricultural production. However, most approaches to biological control of plant diseases have had limited success. An example of this is the fact that in recent decades, individual biocontrol agents have been used to control single pathogens. This may partly explain some of the inconsistent field results, given that individual biological control agents may be inactive in certain agricultural environments in which they are applied or may be ineffective in controlling the various pathogens that attack host plants. Achieving broad-spectrum pathogen control by antagonists that are applied individually or in consortium remains largely an unfulfilled goal for the effective exploitation of biological control. Broadening the use of biological control agents to achieve complementary effects, such as tolerance to limiting abiotic factors such as drought and salinity, biofertilization and bioremediation, among others is also of interest. In addition, the same general biocontrol microorganisms have been used, with very limited discoveries of new biological control agents. However, these investigations require highly efficient screening methods that permit the rapid exploration of many microorganisms. On the other hand, there are multiple pathogens for which no effective biological control alternatives have been developed. This is the case for many phytopathogenic bacteria and viruses, with unexplored potential. Also, the development of new management components that can be integrated with biological control agents to improve the control response has ample room for development and improvement. For example, the discovery and use of elicitors and biostimulating substances is still limited, with the potential for advancement. The same is true for the incorporation of emerging technologies for phytoprotection such as interfering RNA, which open up new possibilities for the sustainable production of crops. With these ideas in mind, this chapter seeks to discuss and expand upon these ideas.

Keywords

Bacteriophages, bioestimulants, biofertilization, biopesticides, bioremediation, elicitors, endophytes, microbial consortia, phytopathogenic viruses, screening, RNAi

Introducción

Los bioplaguicidas son una herramienta ambientalmente amigable y reconocida como un componente importante para el manejo integrado de plagas (MIP), por lo que su combinación con otras opciones biológicas “blandas” ha venido ganando interés. Sin embargo, dada la presión creciente en la agricultura para producir más alimento en menos tierra, se plantea

la necesidad continua de estimular nuevos desarrollos que garanticen la salud vegetal de forma integral y no solamente el manejo de un patógeno particular. En este capítulo se muestran algunas opciones que podrían ampliar el espectro de uso del control biológico y el desarrollo de nuevos componentes de manejo que podrían integrarse con los agentes de control biológico.

Uso de consorcios microbianos en el control biológico

A pesar de los resultados promisorios obtenidos en el control biológico de fitopatógenos, también se han encontrado resultados inconsistentes y variabilidad en su eficacia. Los factores que afectan la actividad de los agentes de control biológico han sido atribuidos a los ambientes adversos (humedad o desecación extremas, temperatura, luz ultravioleta, características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo), a variaciones entre los cultivares objeto de control (exudados, características físicas) y a la interacción entre todos los factores. Esto, sumado a la variación en las prácticas del cultivo (culturales, agroquímicos, otros bioinsumos, etc.), hace que con frecuencia un solo microorganismo no puede reaccionar a estos factores de inestabilidad y, a la vez, mantener su actividad biocontroladora.

La actividad microbiológica depende de la cantidad de agua y oxígeno disponibles. La porosidad del suelo influye en estos parámetros y además existe una relación entre estos factores y los efectos indirectos de las prácticas de manejo del suelo, tales como la labranza (Skopp, Jawson, & Doran, 1990).

De otra parte, se debe considerar que el control biológico de amplio espectro de enfermedades causadas por patógenos vegetales como *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia solani*, entre otros, requiere la introducción o la presencia de fuentes edáficas de nutrientes orgánicos en el suelo para el sustento de los agentes de biocontrol. El nivel de descomposición de la materia orgánica afecta de manera crítica la composición de

los taxa microbianos, así como las poblaciones y las actividades de los agentes de control biológico. La competencia, la antibiosis, el parasitismo y la resistencia inducida se ven afectados. Por ejemplo, las fuentes altamente estabilizadas de turba, frecuentemente, no le dan soporte a los biocontroladores aplicados. Por otra parte, el compost puede servir como una base de nutrición ideal para agentes de biocontrol y ofrece una oportunidad para introducir y establecer agentes específicos de biocontrol en los suelos, lo que, a su vez, conduce a un control biológico sostenido basado en las actividades de las comunidades microbianas (Hoitink & Boehm, 1999).

Los cambios en la composición de la comunidad microbiana del suelo alteran la capacidad fisiológica de dicha comunidad, lo cual tiene consecuencias no solamente sobre los biocontroladores introducidos, sino sobre el ecosistema. Se debe considerar que el uso sucesivo de los suelos para cultivo, además de afectar su química y su estructura, reduce la actividad biológica debido a la disminución de macroagregados que proporcionan un microhábitat importante para la actividad microbiana. La evidencia indirecta sugiere que las enmiendas del suelo, como los abonos animales y verdes y la diversidad de plantas (rotaciones de cultivos), pueden ser más importantes para mantener la actividad y la diversidad microbiana del suelo que la labranza de conservación en sistemas de monocultivo. Cada vez hay más pruebas de que la rotación de cultivos promueve la productividad mediante la supresión de

microorganismos deletéreos que proliferan bajo el monocultivo. Se ha demostrado que las aplicaciones repetidas de agroquímicos (fertilizantes, plaguicidas y herbicidas) pueden suprimir el potencial biológico de los suelos manejados convencionalmente (Chen, Edwards, & Subler, 2001; Dick, 1992).

Una tendencia emergente es el uso de mezclas de microorganismos compatibles y diversos, ya que se ha demostrado que múltiples microorganismos pueden ser superiores en su efecto biocontrolador que uno solo, pues proporcionan mayor eficacia, consistencia y confiabilidad cuando son evaluados en diferentes campos (figura 20.1) (Kloepper et al., 2004; Stockwell, Johnson, Sugar, & Loper, 2011). Además, la combinación de microorganismos puede aumentar el espectro de acción para controlar diversas enfermedades en el mismo cultivo. Adicional al mayor control de las enfermedades, se ha observado un aumento en el efecto promotor del crecimiento vegetal al utilizar consorcios

microbianos basados en diversos biocontroladores, tales como *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., etc., en trigo, rábano, garbanzo, tomate, pimiento, *Arabidopsis* y guisante (Duffy, Simon, & Weller, 1996; Jetiyanon, 2007; Kannan & Sureendar, 2009; Rudresh, Shivaprakash, & Prasad, 2005; Srinivasan & Mathivanan, 2011). Así mismo, una mezcla de *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma hamatum* y *Streptomyces coelicolor* redujo el marchitamiento vascular producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Ochoa & Cotes, 1998). Otra mezcla con base en *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* mostró capacidad para estimular respuestas de defensa en guisantes contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Jain, Poulos, Gros, Chakravarty, & Shuman, 2011) y una mezcla de *B. subtilis* con *T. harzianum* suprimió eficazmente la marchitez por *Fusarium* en garbanzo mediante inducción de resistencia sistémica (Moradi, Bahramnejad, Amini, Siosemardeh, & Haji-Allahverdipoor, 2012).

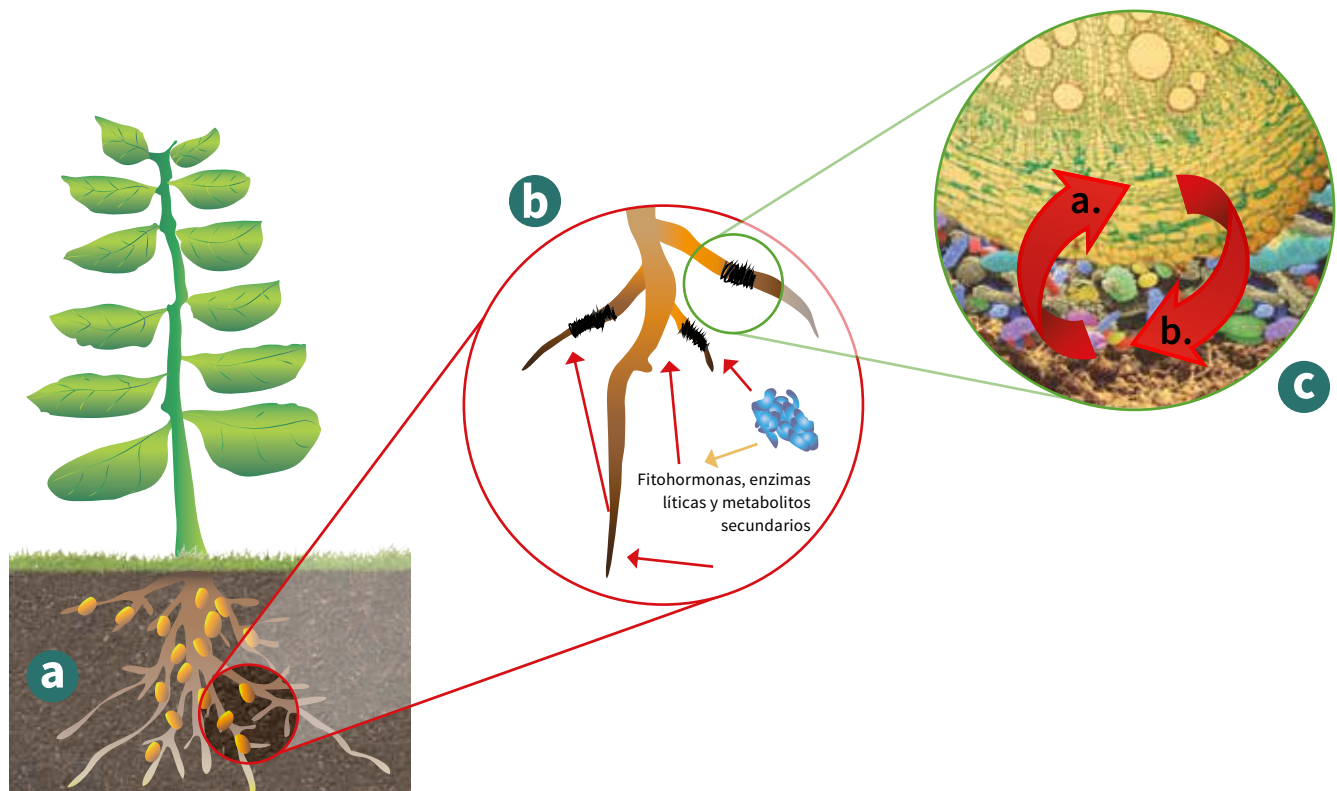


Figura 20.1. Consorcios microbianos y salud vegetal. a. Colonización de los microorganismos en la rizosfera; b. Efecto de control biológico mediante mecanismos de acción complementarios; c. Interacción entre la raíz, el patógeno, el biocontrolador y el microbioma del suelo.

Fuente: Elaboración propia

De otra parte, se demostró que dos consorcios, el primero basado en *Bacillus licheniformis* con *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptomyces fradiae* y el segundo consistente en *B. licheniformis*, *Bacillus* sp. y *P. aeruginosa*, controlaron el virus de la necrosis del girasol y mejoraron significativamente los rendimientos del cultivo (Srinivasan & Mathivanan, 2011). Así mismo, se han sobrepasado los límites de la fitopatología utilizando mezclas de cepas de entomopatógenos con antagonistas. En un consorcio constituido por *B. bassiana* y *P. fluorescens* se logró el control simultáneo del minador de hojas (*Aproaerema*

modicella) en cacahuets y de *Sclerotium rolfsii* cuando se aplicó a las semillas, al suelo y al follaje para el control simultáneo (Senthilraja et al., 2010). Una mezcla basada en un granulovirus y en *Trichoderma koningiopsis*, al ser aplicada sobre tubérculos de papa, controló simultáneamente a la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* y *Rhizoctonia solani* (Santos, Villamizar, García, Beltrán, & Cotes, 2016). También se han desarrollado estudios que evalúan consorcios microbianos compatibles que, además de tener efectos antagonistas contra los fitopatógenos, participan en la conversión de nutrientes y en su movilidad.

Bioplaguicidas con actividad biofertilizante y biorremediadora

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM, por la sigla en inglés de *plant growth promoting microorganism*) son heterogéneos en su naturaleza, comprenden bacterias, hongos y actinomicetos que sobreviven en y alrededor de la rizosfera y mejoran el crecimiento de la planta y el rendimiento, ya sea directa o indirectamente (Hariprasad, Navya, Chandra, & Niranjana, 2009). Un PGPM eficaz, además de ser competente en la rizosfera, debe ser capaz de hacer frente al estrés biótico y abiótico y de desarrollar múltiples funciones. La promoción directa del crecimiento de las plantas implica la solubilización o movilización de nutrientes importantes (fósforo, potasio, zinc, azufre y hierro) o la fijación de nitrógeno atmosférico para la absorción de las plantas. También se sabe que estos producen varias fitohormonas que promueven el crecimiento de las plantas, como el ácido indolacético, el ácido giberélico, las citoquininas y el etileno (Arshad & Frankenberger, 1993), y reducen el efecto deletéreo de los fitopatógenos (Maiyappan, Amalraj, Santhosh, & Peter, 2010).

Microorganismos biocontroladores tales como *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., además de ejercer su efecto primario de control, pueden estimular el crecimiento de la planta (efecto secundario) en ausencia del patógeno (Kloepper, Lifshitz, & Zablutowicz, 1989; Li et al., 2015; Rajasekhar, Satish, Sain, & Divya, 2016). Así mismo, los microorganismos biofertilizantes pueden ejercer actividad biocontroladora. Por ejemplo, al utilizar la bacteria *Rhizobium* spp.

como promotor de crecimiento, además de mejorar la productividad de las plantas (efecto primario), tuvo efecto en el control de enfermedades (efecto secundario) (Rajasekhar et al., 2016).

En un estudio de invernadero realizado por Raupach y Kloepper (1998), se demostró que las rizobacterias promotoras del crecimiento (*plant growth promoting rhizobacteria* [PGPR, por la sigla en inglés]) *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*, al ser usadas tanto individualmente como en mezcla, fueron efectivos biocontroladores contra múltiples patógenos del pepino. La mezcla, al ser aplicada en semillas, demostró una alta promoción del crecimiento de las plantas y una reducción significativa de la enfermedad. De manera similar, los tetra-inoculantes (*Mesorhizobium-Azotobacter-Pseudomonas-Trichoderma*) demostraron atributos significativos de crecimiento, rendimiento y control de fitopatógenos cuando se aplicaron a las semillas de garbanzo (Prakash Verma, Yadav, Tiwari, & Jaiswal, 2013).

Teniendo en cuenta las múltiples funciones que pueden tener los microorganismos benéficos y las interacciones que establecen con las plantas, es posible desarrollar productos multifunción, dependiendo de los efectos positivos que puedan generar y de sus modos de acción. Estos productos pueden utilizarse como bioplaguicidas, fitoestimuladores, biofertilizantes, biorremediadores e inductores de resistencia frente a factores abióticos como sequía y salinidad, entre otros.

En el caso de las bacterias promotoras del crecimiento (PGPR), que además están relacionadas con la salud vegetal, se les atribuyen mecanismos variados como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno, ingeniería de la rizosfera, producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC), interferencia de la señal *quorum sensing* (QS) e inhibición de la formación de biopelículas, producción de fitohormonas, actividad antifúngica, producción de compuestos orgánicos volátiles (*volatile organic compounds* [VOC, por la sigla en inglés]), inducción de resistencia sistémica, estimulación de microorganismos benéficos vegetales e interferencia en la producción de las toxinas de los patógenos (Bhattacharyya & Jha, 2012).

Además de su capacidad biodegradadora derivada de sus actividades enzimáticas, de tipo quitinasa, β -1, 3-glucanasa y celulasa (Nielsen & Sørensen, 1997; Sindhu & Dadarwal, 2001), pectinasas, proteasas y amilasas (De Vasconcellos & Cardoso, 2009; O'Sullivan, Stephens, & O'Gara, 1991), estas bacterias han demostrado capacidad para reducir factores de estrés abiótico como la salinidad o la sequía (Yang, Kloepper, & Ryu, 2009) o para biorremediar los suelos y el agua. Los microorganismos son mucho más sensibles al estrés causado por metales pesados que los animales del suelo o que las plantas que crecen en los mismos suelos, por lo tanto, estos metales producen cambios en la función microbiana y, en consecuencia, en la biodiversidad dentro de las poblaciones y en las comunidades microbianas (Giller, Witter, & Mcgrath, 1998). Bacterias tales como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. pueden biorremediar metales pesados tales como cadmio y níquel (Andreoni, Colombo, Colombo, Vecchio, & Finoli, 2003; Guo et al., 2010; Qian et al., 2012), petróleo (Das & Mukherjee, 2007; Jalilzadeh Yengejeh et al., 2014; Zhu, Zhang, Chen, Cai, & Lin, 2016); PAH (por la sigla en inglés de *polycyclic aromatic hydrocarbons*) (Hunter, Ekunwe, Dodor, Hwang, & Ekunwe, 2005) y plaguicidas, tales como el methyl parathion y el diazinon (Abo-Amer, 2011).

Así mismo, algunos microorganismos como *Trichoderma* spp., además de su demostrada actividad biocontroladora, también influyen en el desarrollo vegetal mediante la solubilización de fosfato y micronutrientes (Altomare, Norvell, Björkman, & Harman,

1999; Li et al., 2015), la producción de fitohormonas (Cai et al., 2013; Vinale et al., 2006), la inducción de resistencia sistémica (Cai et al., 2013; Moreno et al., 2009), la reducción de contaminantes orgánicos e inorgánicos y la regulación de la microflora rizosférica (Adams, De-Leij, & Lynch, 2007; Huang, Chen, Ran, Shen, & Yang, 2011). Ha demostrado capacidad para degradar cianuro (Ezzi & Lynch, 2005) y compuestos fenólicos mediante la producción de la enzima lacasa (Chakroun, Mechichi, Martinez, Dhouib, & Sayadi, 2010), así como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), muchos de los cuales son tóxicos, mutágenos o cancerígenos (Matsubara, Lynch, & De Leij, 2006), metales pesados tales como el cadmio y el níquel (Nongmaithem, Roy, & Bhattacharya, 2016) y plaguicidas como la atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$), que es un herbicida con acción sistémica tóxica a corto y mediano plazo, ya que no se degrada fácilmente e inhibe la fotosíntesis.

Además, este compuesto causa serios cambios ambientales y es un interruptor endocrino (DE), pues afecta la función reproductiva en los vertebrados y causa efectos teratogénicos en los seres humanos (Cooper et al., 2007; Raymundo Raymundo et al., 2009). *Trichoderma* también degrada organofosforados, los cuales, debido a su solubilidad en agua, son capaces de infiltrarse a través del suelo y de causar daños ambientales considerables (Zhang, Bruton, Howell, & Miller, 1999).

Este efecto simultáneo del control de fitopatógenos y de la reducción de factores de estrés para la planta mediante la biorremediación de xenobióticos (compuestos tóxicos), que además causan serios problemas ambientales y ponen en peligro la salud humana y animal, es muy deseable dentro de una agricultura sostenible. Por lo tanto, en el futuro se esperan bioproductos que puedan cumplir múltiples funciones que favorezcan a la planta y al medioambiente. Sin embargo, esto solo será posible si se llevan a cabo investigaciones interdisciplinarias que combinen los conocimientos de los expertos en diferentes aplicaciones, tales como control biológico, biofertilización, biorremediación, interacciones planta-microorganismo, benéfico-patógeno y su señalización con el medioambiente, además de fermentación, formulación, gestión empresarial innovadora, comercialización de bioplaguicidas y educación de los usuarios potenciales de estas tecnologías

y del público en general. Visualizando las historias de éxito de la combinación de consorcios microbianos que interactúan sinérgicamente sobre microorganismos individuales, actualmente se están diseñando consorcios con mayor alcance, ya que se busca que intervengan en el manejo de cultivos. Esto, por supuesto, implicará el

abordaje de la extrema complejidad de las interacciones y de las deficiencias actuales, así como de las áreas potenciales que se requieren para superar futuras investigaciones. En la figura 20.2 se ejemplifican los efectos más importantes que pueden tener los microorganismos biocontroladores.

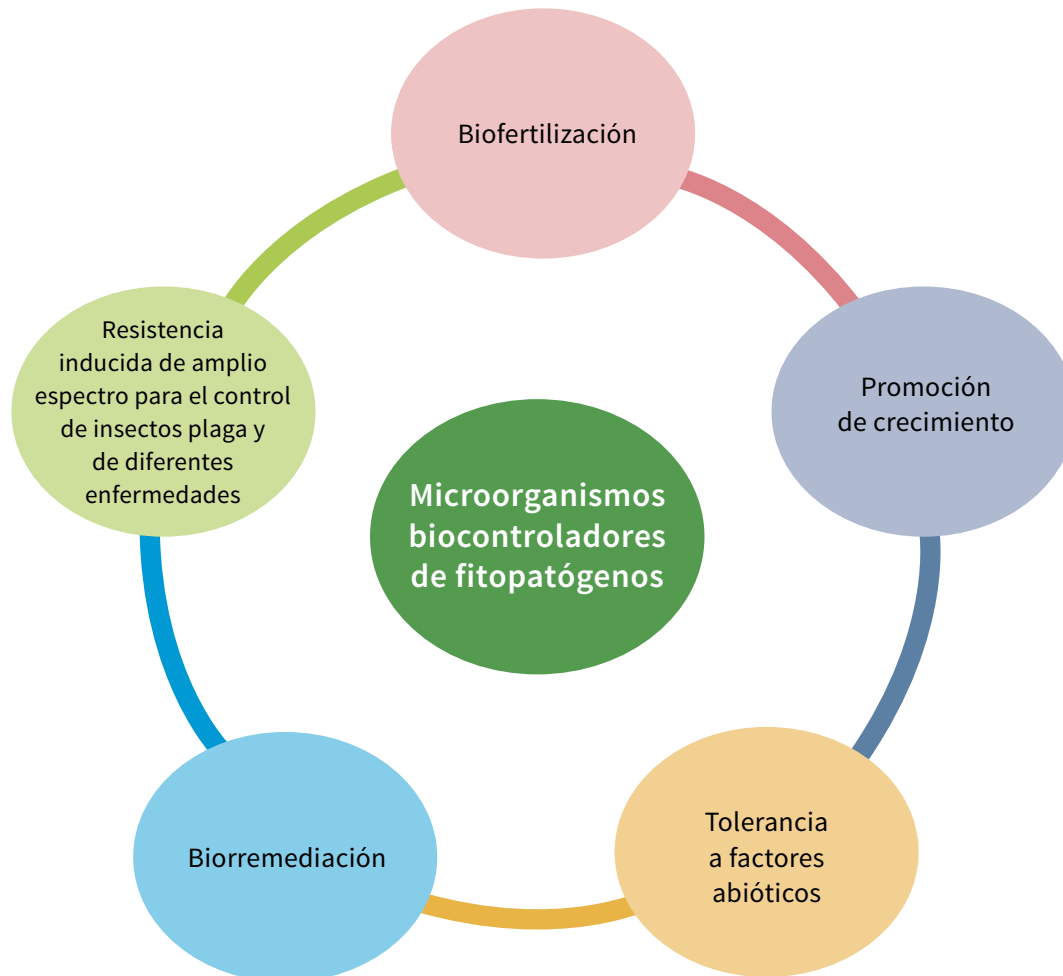


Figura 20.2. Múltiples efectos de los microorganismos biocontroladores.

Fuente: Elaboración propia

Screening de alta eficiencia para el descubrimiento de nuevos agentes de control biológico

Para desarrollar agentes de control biológico eficaces para el manejo de fitopatógenos, las colecciones microbianas deben someterse a paradigmas de *screening* eficientes con el objetivo de identificar candidatos de alta calidad con potencial para controlar

la enfermedad de interés en entornos agrícolas. Para la selección de los agentes de control biológico se considera, en primer lugar, al patógeno objetivo que causa la enfermedad y, posteriormente, el sistema de ensayo que permita establecer los rasgos microbianos

antagónicos de este patógeno. Los microorganismos candidatos que son seleccionados a través de ensayos de detección de biocontroladores potenciales se someten a otras pruebas, tales como la optimización del efecto de biocontrol y la evaluación de los riesgos asociados que pueden tener estos agentes para evitar organismos que causen problemas ambientales o enfermedades en humanos (Alabouvette & Cordier, 2011).

Con el objetivo de poner el agente de control biológico en el mercado, la identificación de microorganismos candidatos *in vitro* en condiciones de laboratorio es solo el punto de partida. Los potenciales agentes de control biológico seleccionados se llevan luego a ensayos en plantas, tanto en invernadero como en el campo. Debido a que los ensayos *in vivo* proporcionan condiciones experimentales que pueden ser muy diferentes en comparación con las condiciones *in vitro*, los microorganismos que se desempeñan bien en los ensayos simples de detección a menudo fracasan en entornos más complejos. Idealmente, con suficientes recursos, la selección de biocontroladores siempre tendría que hacerse en condiciones de semicampo o de campo. Desafortunadamente, el esfuerzo de probar cientos a miles de aislamientos microbianos en campo es prohibitivo, incluso en los entornos de investigación bien financiados. Por lo tanto, el desarrollo de métodos robustos de *screening* es crucial para mejorar la tasa de éxito de los ensayos de campo.

El aislamiento de microorganismos, la evaluación de su actividad y el establecimiento de colecciones (bancos de germoplasma) en las cuales se preserven las características de origen de cada cepa son etapas indispensables en el desarrollo de bioplaguicidas. El aislamiento de los potenciales agentes de control biológico se ha hecho principalmente en nichos ecológicos que muestran actividades microbianas benéficas, tales como suelos supresivos de enfermedades o plantas sanas desarrolladas en campos donde haya alta incidencia de la enfermedad (Fravel, 2005; Montesinos, 2003). Una vez establecidas estas colecciones de microorganismos, se someten a ensayos para seleccionar los candidatos más prometedores. Muchos autores han documentado diversos rasgos microbianos y modos de acción que están correlacionados con el control biológico (Campbell, 1991; Howell, 2003; Kesarcodi-Watson, Kaspar, Lategan, & Gibson, 2008; Roberts & Lohrke, 2003). Debido a esto, algunos grupos de

investigación se han enfocado en los sistemas de *screening* que identifican microorganismos, independientemente de su modo de acción, que excluyen al patógeno objetivo a nivel orgánico. En los últimos años, sin embargo, los investigadores están comenzando a centrarse en actividades específicas. Tal es el caso del *screening* de alto rendimiento a nivel orgánico y a nivel de bioactividades específicas a las que se referirá este documento.

Screening a nivel orgánico

Los hongos y los oomicetos patógenos de plantas, como *Fusarium* spp., *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*, pueden afectar considerablemente la productividad de los sistemas agrícolas (Pliego, Ramos, De Vicente, & Cazorla, 2011). Habitualmente los ensayos clásicos *in vitro* para identificar actividades bacterianas antagónicas al crecimiento de hongos se evalúan midiendo zonas de inhibición del crecimiento caracterizadas por un área libre en medio del cultivo sólido, entre las colonias bacterianas y las hifas de hongos, en un ambiente de cocultivo. Los potenciales agentes de control biológico se clasifican cuantificando y clasificando el tamaño de la zona de inhibición. Si bien este tipo de *screening* es bastante barato, es difícil utilizarlo como *screening* de alto rendimiento, dado que la medición de la zona de inhibición en las cajas de Petri debe hacerse manualmente. Sin embargo, Shehata, Lyons, Jordan y Raizada (2016) lograron analizar las actividades antifúngicas de una colección de cultivo bacteriano que constaba de 190 endófitos aislados de plantas del género *Zea* con dos patógenos vegetales objetivo. En esta investigación se encontró que cinco cepas eran activas contra *Sclerotinia homoeocarpa* y *Rhizoctonia solani*. Varios reportes sugieren que la correlación entre los ensayos *in vitro* y las actividades *in planta* es baja (Fravel, 2005; Haas & Keel, 2003; Renwick, Campbell, & Coe, 1991), aunque Shehata et al. (2016) encontraron que tres y cuatro cepas, respectivamente, retenían sus actividades de control biológico cuando se probaron en pasturas contra *Sclerotinia homoeocarpa* y *Rhizoctonia solani*.

En un ensayo de alto rendimiento, Bosmans et al. (2017) evaluaron la actividad biocontroladora de

aproximadamente 150 aislamientos bacterianos contra 35 cepas del patógeno bacteriano *Agrobacterium* biovar 1, causante de la enfermedad de la raíz peluda del tomate. Este enfoque de *screening* utilizó un sistema robótico de recogida de colonias en un ensayo de superposición en agar. En esta configuración, los microorganismos de la colección se cultivaron en microplacas de 96 pozos. El robot de recogida de colonias se equipó con un cabezal de 96 alfileres y se usó para transferir los cultivos microbianos desde las microplacas a placas planas OmniTray para dejar crecer los microorganismos durante la noche (figura 20.3). Al día siguiente, se usó un medio de cultivo sólido previamente inoculado con el patógeno *Agrobacterium* biovar 1 para superponer en él las colonias de los potenciales biocontroladores. Después de la incubación de las placas coinoculadas superpuestas, se cuantificó la actividad antagonista, presumiblemente debida a metabolitos difusibles, midiendo manualmente el tamaño de las zonas de inhibición. De las 150 cepas bacterianas de diversos géneros ensayados, se identificaron siete cepas de *Paenibacillus* estrechamente relacionadas con la actividad biocontroladora. El análisis detallado reveló que algunas de esas siete especies mostraron actividad

contra las 35 cepas del patógeno *Agrobacterium* biovar 1, mientras que otras fueron activas solo contra algunas de estas.

El sistema de *screening* anterior, aunque fue usado para un número de microorganismos relativamente pequeño, tiene el potencial de analizar la actividad biocontroladora de una gran colección de microorganismos. Dada la escasez de reactivos y del personal requerido, este ensayo podría modificarse fácilmente para detectar varios miles de aislamientos microbianos en cuestión de meses. Sin embargo, una de las limitantes de este sistema es la medición manual de las zonas de inhibición. Esta es una cuestión persistente si se buscan actividades contra patógenos fúngicos o bacterianos. Sin embargo, con un enfoque creativo para el desarrollo del ensayo, se pueden identificar alternativas. Por ejemplo, Figueroa-López, Cordero-Ramírez, Quiroz-Figueroa y Maldonado-Mendoza (2014) desarrollaron un ensayo de antagonismo líquido en microplacas de 96 pozos que permitió analizar la actividad biocontroladora de una colección bacteriana de 11.520 aislamientos contra el patógeno del maíz *Fusarium verticillioides* (Figueroa-López et al., 2016). En este caso, la biomasa fúngica

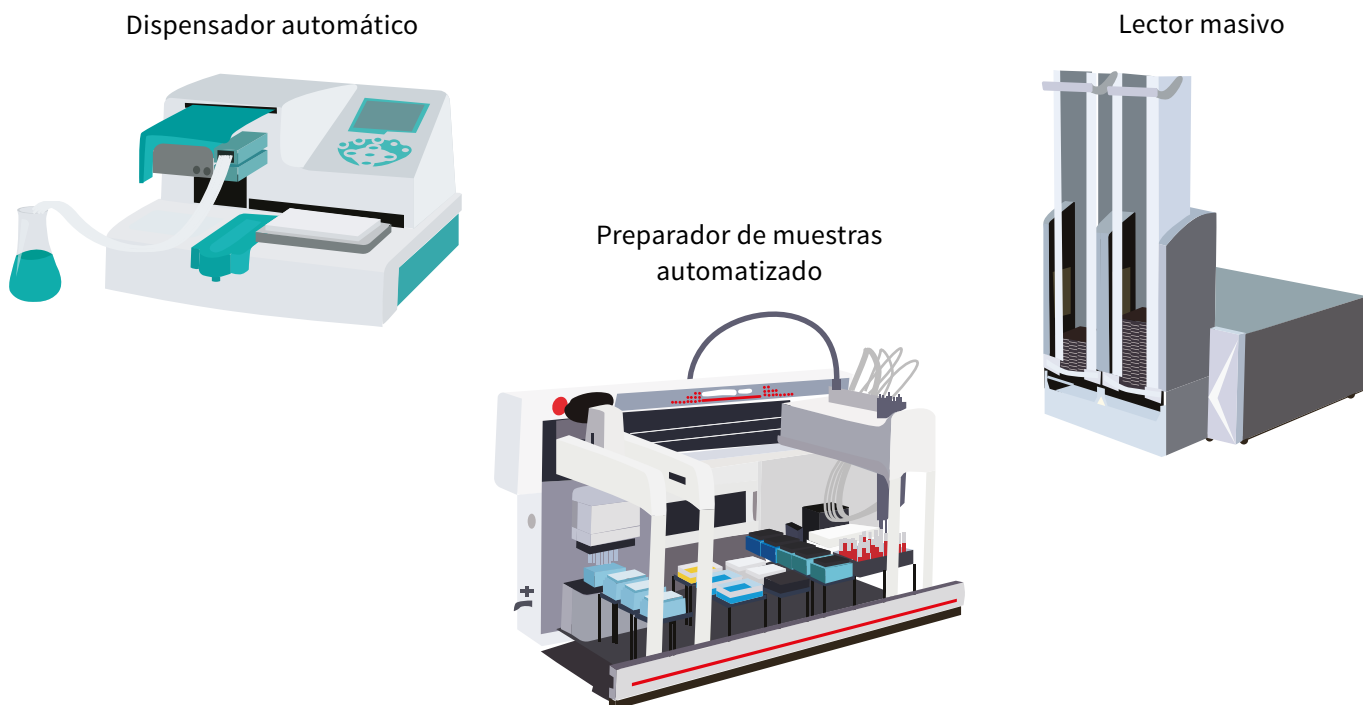


Figura 20.3. Equipos comúnmente utilizados en *screening* de alta eficiencia.

Fuente: Elaboración propia

se cuantificó por tinción de los residuos de quitina de la pared celular de hongos usando una lectina de aglutinina de germen de trigo acoplada a un fluoróforo (conjugado wGA Alexa Fluor 488). El poder de este análisis se basa en la cuantificación automatizada de los resultados experimentales, que se hace mediante un lector de placas con capacidad de detección de fluorescencia para determinar la biomasa de los hongos. Para identificar los agentes de control biológico bacteriano, los autores de estos informes establecieron arbitrariamente como criterio de selección aquellas bacterias capaces de inhibir mínimo en un 50% el crecimiento de los hongos; así, mediante este nivel de rigurosidad, identificaron 622 cepas bacterianas candidatas con alta actividad antimicótica. Aunque este número sigue siendo alto, redujo en gran medida el número de aislamientos iniciales, lo que permite una búsqueda más precisa de rasgos deseables adicionales, como la actividad *in planta*, la colonización de plantas, la movilización de nutrientes, la tolerancia a la desecación y a la reconstitución y la facilidad de fermentación y de formulación.

Screening al nivel de bioactividad

En la sección anterior, los ejemplos presentados estaban enfocados en las actividades de biocontrol con modos de acción indefinidos, centrados en una lectura relacionada con el crecimiento microbiano, o, más bien, en el antagonismo del crecimiento microbiano. Sin embargo, se han documentado varios modos de acción definidos en el control biológico de fitopatógenos, por lo que algunos laboratorios centran sus paradigmas de *screening* en modos de acción específicos. Una actividad de este tipo es la producción de sideróforos, que son compuestos quelantes de iones férricos de alto peso molecular y de alta afinidad que son producidos por bacterias y hongos que eliminan el hierro del medioambiente (Neilands, 1995). Como el hierro es, a menudo, una limitante, su captura se asocia con el control biológico porque los sideróforos reducen su disponibilidad para los fitopatógenos (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012; Kloepper, Leong, Teintze, & Schroth, 1980). Esto se ha demostrado en muchos ejemplos, como en el caso de los sideróforos producidos por *Bacillus subtilis* que ejercen un papel significativo en el control biológico de *Fusarium*

oxysporum, causante del marchitamiento de pimiento (Yu, Ai, Xin, & Zhou, 2011). En el desarrollo de un *screening* de alto rendimiento para la actividad de sideróforos, Marques, Walshe, Doyle, Fernandes y De Carvalho (2012) adaptaron un ensayo que utiliza el reactivo indicador cromo azulol S, que se compacta firmemente con el hierro férrico y adquiere un color azul. Los sideróforos, debido a su mayor afinidad por el hierro férrico, eliminan competitivamente el sustrato férrico del complejo indicador y provocan un cambio de color, de azul a naranja. Estos autores realizaron la evaluación de aproximadamente 500 microorganismos en microplacas y usaron un analizador de imágenes para evaluar el cambio de color y determinar la capacidad de producción de sideróforos. En última instancia, se identificaron 11 cepas bacterianas con altos niveles de producción de sideróforos, que además fueron capaces de mantener sus niveles al ser producidas en fermentadores agitados de cinco litros.

Otra actividad utilizada en los procedimientos de *screening* de alta eficiencia se centra en la detección del *quorum sensing*, que es un sistema de señalización célula a célula encontrado en algunos patógenos que utilizan moléculas difusibles pequeñas, como la N-acil-homoserina lactona, como medio para detectar su propia densidad de población y sincronizar la expresión de los genes de virulencia (Chen, Gao, Chen, Yu, & Li, 2013). Algunos agentes biocontroladores interfieren con los sistemas de detección de *quorum sensing* de los patógenos mediante una actividad denominada *quorum quenching*. Por ejemplo, *Bacillus* sp. 240B codifica para una lactonasa que puede inactivar la N-acil-homoserina lactona y atenúa la señalización del *quorum sensing* en *Pectobacterium caratovorum*, el agente causante de la pudrición blanda de la papa (Dong, Xu, Li, & Zhang, 2000). Para identificar microorganismos biocontroladores con actividades de *quorum quenching*, Tang et al. (2013) desarrollaron un sistema de alto rendimiento con microplacas de 96 pozos y leyeron el ensayo con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* A136. Esta cepa bacteriana fue diseñada para detectar una amplia gama de N-acil-homoserina lactonas a través de un sistema transgénico que enlaza un factor de transcripción sensible a la N-acil-homoserina lactona con la expresión del reportero lacZ (que genera un color azul en presencia de X-gal). Para identificar microorganismos con actividad *quorum*

quenching lactonasa, se evaluaron aproximadamente 350 aislamientos microbianos que se cultivaron en presencia de N-acil-homoserina lactona y se incubaron durante 24 horas. Los sobrenadantes de cultivo se transfirieron a placas de microtitulación que contenían el biosensor A136 de *A. tumefaciens* y la solución de ensayo X-gal durante 12 horas. En los pozos control y en los pozos experimentales sin actividad de *quorum quenching* se produjo un color azul por la expresión de X-gal en el biosensor. Sin embargo, en los pozos del control positivo y en aquellos en los que los potenciales biocontroladores presentaron actividad de *quorum quenching*, la N-acil-homoserina lactona desactivada redujo o eliminó la expresión de X-gal. Los resultados se cuantificaron utilizando un lector de placas espectrofotométricas, y, de las 366 cepas bacterianas evaluadas, se encontró que 25 de ellas, pertenecientes a 14 especies, tuvieron actividad *quorum quenching*.

Consideraciones finales

Las técnicas de aislamiento de microorganismos han permitido obtener suficiente diversidad biológica, tanto que podría durar, aparentemente, toda la vida si se tiene en cuenta que varios tipos de suelos tienen poblaciones bacterianas del orden de 10^6 a 10^9 células por gramo (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Las tendencias recientes han mostrado que muchos laboratorios académicos, gubernamentales e industriales se han enfocado en la identificación de diversas actividades microbianas para usos agrícolas. Sin embargo, a menudo muchos rasgos microbianos identificados en el laboratorio no cumplen con las expectativas sobre su efecto en el campo. Idealmente,

un primer enfoque de *screening* en campo ayudaría a eliminar estas preocupaciones, pero el costo de estas evaluaciones sería prohibitivo. Por lo tanto, muchos grupos de investigación han tratado de hacer confluír estas dos realidades mediante análisis iniciales de grandes colecciones microbianas para aumentar el número de candidatos de alta calidad, que puedan ser evaluados en pruebas de campo.

Al final, el número de microorganismos identificados, idealmente con múltiples rasgos benéficos para la agricultura, se reduciría a unos pocos. Si se analizan suficientes aislamientos microbianos, se incrementan las posibilidades de encontrar cepas adaptadas a las condiciones medioambientales en las que serían aplicadas, versátiles, fácilmente fermentables y formulables y altamente efectivas para el control de las enfermedades para las cuales se busca una solución.

Es evidente que la automatización del laboratorio aumentará el nivel de rendimiento de cualquier sistema de *screening*, pero también aumentará los costos asociados a la compra del equipo, los consumibles y el mantenimiento. Además, la detección de un número tan elevado de microorganismos crea sus propios problemas, particularmente en términos de manejo de los datos obtenidos. La caracterización de decenas o cientos de miles de microorganismos con ensayos múltiples puede sumarse muy rápido y generar millones de datos para administrar. Los sistemas de información son ideales para almacenar y consultar grandes volúmenes de datos, pero requieren de personal especializado para establecer las bases de datos y para mantenerlas adecuadamente. Los analistas deben tener experiencia en estadística para entender los datos generados, seleccionar los mejores candidatos y correlacionar las actividades de laboratorio con los éxitos en campo.

Control biológico de virus de plantas

Es bien conocido que las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (PGPR) y los endófitos son herramientas usadas para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas en las plantas, pero también son capaces de controlar algunos de sus virus. Bacterias como *Pseudomonas fluorescens* (PGPR, cepa 89B-27) y *Serratia*

marcescens (endófito, cepa 90-166) indujeron resistencia sistémica en el pepino contra algunas enfermedades fúngicas y bacterianas. Además, aplicadas en las semillas, mostraron capacidad para proteger las plantas de pepino del desarrollo de la enfermedad *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Raupach, Liu, Murphy, Tuzun, & Kloepper, 1996).

Igualmente, plantas de banano tratadas con bioformulaciones en mezcla de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* (Pf1) y la cepa endófito *Bacillus* sp. (EPB22) fueron eficaces en la reducción de la incidencia de *Banana bunchy top virus* (BBTV) bajo condiciones de invernadero (80 %) y en campo (52 %) (Harish, Kavino, Kumar, Balasubramanian, & Samiyappan, 2009). El hongo endófito en raíz *Piriformospora indica*, con propiedades de promover el crecimiento vegetal en muchas especies vegetales y de inducir resistencia contra patógenos de raíces y brotes en cebada, trigo y *Arabidopsis*, influyó en la reducción de la concentración del *Pepino mosaic virus* (PepMV) en tomates (Fakhro et al., 2010).

Hasta el momento, microorganismos como las PGPR y los endófitos aún no han sido registrados para el control de virus porque no se han evaluado ampliamente en campo para el control de estos patógenos. Sin embargo, parecen tener un amplio espectro de control de enfermedades virales. Por lo tanto, en un futuro se esperarían más estudios al respecto.

Una estrategia interesante en esta área es el uso de un endófito para el control del vector de la enfermedad viral

más importante de la lechuga, conocida como *vena ancha*, causada por *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV). Su vector es el hongo oomicete *Olpidium virulentus*, habitante del suelo y parásito obligado de raíces; sin embargo, su control químico es difícil (Iwamoto, Aino, Kanto, & Maekawa, 2003). Aino, Iwamoto, Hashimoto e Ishikawa (2007) aislaron cientos de endófitos de raíces de plantas del género *Brassica* y de lechuga, evaluaron su actividad de inhibición de las zoosporas en raíces de lechuga y encontraron que algunos aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* bloquearon la infestación de zoosporas. Bajo una severa infestación, estos endófitos lograron un control adecuado de la enfermedad y el 100 % de la lechuga cosechada fue apta por tamaño y calidad para su venta comercial. Como el tratamiento con *P. fluorescens* en campo aumentó los costos y las labores por mano de obra, se desarrolló una nueva tecnología de revestimiento de semillas: en primer lugar, se inoculó el endófito entre la semilla de lechuga y su testa usando presión reducida. Las semillas inoculadas se secaron a baja temperatura y se formularon como *semillas recubiertas* o *peletizadas*. Las semillas tratadas con *P. fluorescens* fueron 100 % activas durante tres meses a 4 °C (Aino et al., 2007).

Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos

El manejo de bacterias fitopatógenas se hace principalmente mediante el uso de antibióticos (tetraciclina y estreptomycin) y cobre. Este último se ha usado por más de cien años y los antibióticos, como la estreptomycin, se han utilizado desde 1950 (Cooksey, 1990; McManus, Stockwell, Sundin, & Jones, 2002). La estreptomycin se ha utilizado para el control de varias bacterias, incluyendo especies de *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas syringae*, y especies de *Xanthomonas*, tales como *Xanthomonas vesicatoria*, entre otras; la resistencia a este antibiótico ha sido reportada regularmente después de su uso (Cooksey, 1990; Dye, 1953; Thayer & Stall, 1961). Otra preocupación respecto al uso de antibióticos es la propagación de genes de resistencia a otras bacterias, incluyendo bacterias no patógenas o patógenas presentes en el medioambiente (McManus et al., 2002). La resistencia al cobre también se ha documentado para las bacterias fitopatógenas

(Behlau, Canteros, Minsavage, Jones, & Graham, 2011; Bender & Cooksey, 1986; Cooksey, 1994; Lee, Hendson, Panopoulos, & Schroth, 1994). Además, su aplicación continua puede conducir a niveles tóxicos de este compuesto en el medioambiente (Hirst, Le Riche, & Bascomb, 1961; Pietrzak & McPhail, 2004).

Existe un creciente interés en el uso de bacteriófagos (fagos) como agentes de control biológico (*biological control agents* [BCA, por la sigla en inglés]). Los fagos son virus que infectan específicamente bacterias, pero no tienen efectos negativos directos sobre animales o plantas. La infección de una bacteria por un fago virulento se produce como resultado de su rápida replicación viral, seguida por la lisis de la bacteria y la liberación de numerosos fagos de progenie (figura 20.4).

Los fagos tienen gran importancia desde una perspectiva ecológica, dada la modulación que ejercen sobre poblaciones microbianas, lo cual impacta

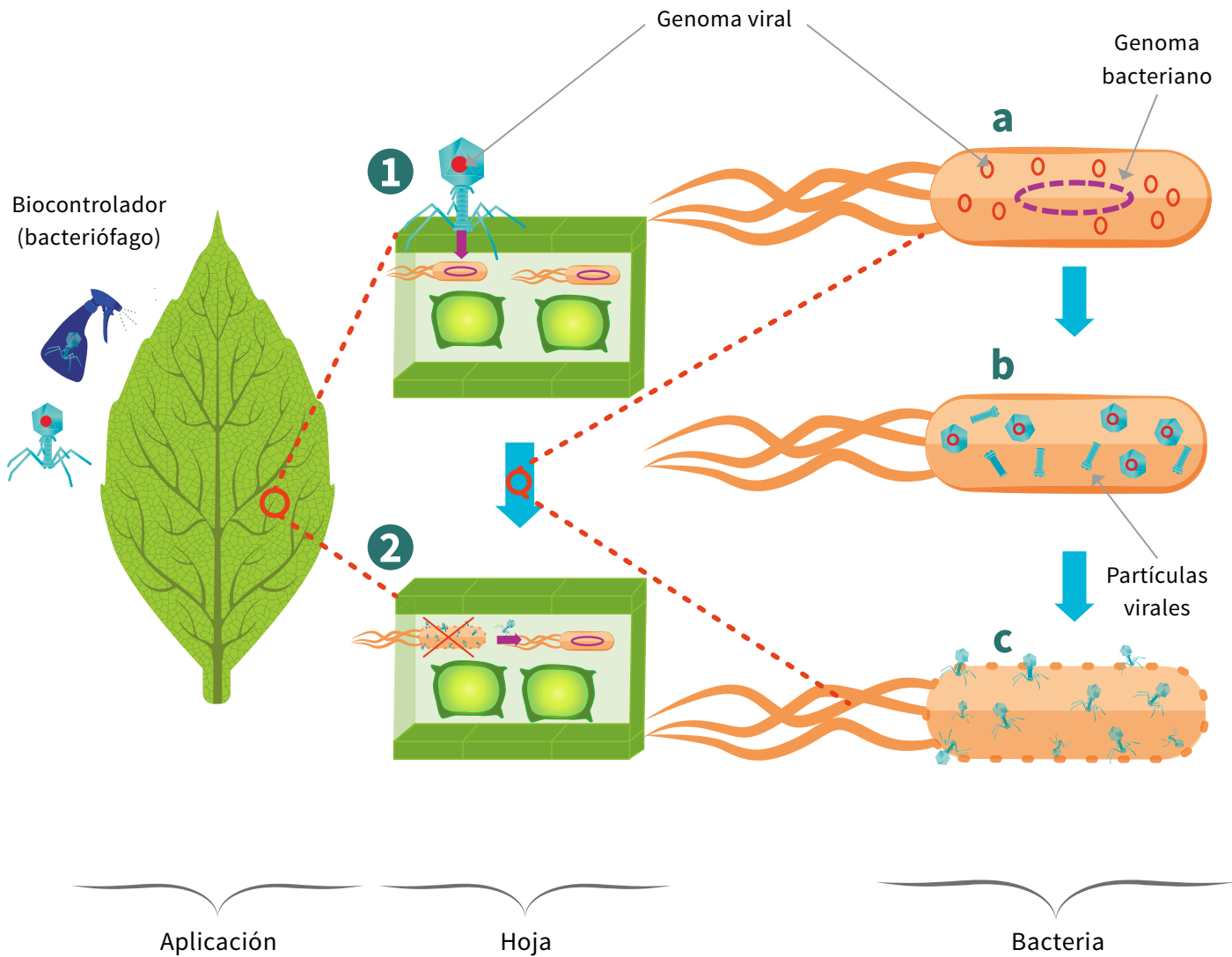


Figura 20.4. Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos. Ciclo de vida: 1. Infección del bacteriófago e inserción del genoma viral en la bacteria; a. Inserción del genoma viral en la bacteria y degradación del genoma bacteriano; b. Replicación del genoma viral y síntesis de proteínas virales; c. Ensamblamiento y liberación; 2. Liberación de nuevos bacteriófagos y muerte de la célula bacteriana.

Fuente: Elaboración propia

procesos críticos en ecosistemas oceánicos, edáficos y animales (Krishnamurthy, Janowski, Zhao, Barouch, & Wang, 2016). Además, por su enorme diversidad, son considerados como “la entidad biológica predominante en el planeta” (traducción propia) (Grose & Casjens, 2014).

El descubrimiento de los bacteriófagos realizado por Twort (1915) y por Moore (1926) a principios del

siglo xx abrió las puertas para su uso en el control de bacterias fitopatógenas (D’Herelle, 1911). Los pioneros Mallmann y Hemstreet (1924) observaron que los filtrados del líquido recogido de repollo en descomposición impidieron el crecimiento de la bacteria causante de dicha pudrición, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Estos autores y Moore (1926) encontraron que la sustancia inhibidora o “agente invisible represor de bacterias en cultivo”

solo se obtenía de filtrados de plantas enfermas de repollo y tabaco respectivamente. En 1925, Coons y Kotila demostraron que los bacteriófagos aislados del suelo suprimieron el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, el agente causal de la enfermedad de la pata negra de la papa. Adicionalmente, aislaron fagos activos contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Agrobacterium tumefaciens* de diferentes fuentes ambientales, como agua de río y suelo (Coons & Kotila, 1925).

Thomas (1935) condujo los primeros ensayos exitosos en campo, mediante el tratamiento de semillas con fagos, contra *Pantoea stewartii* en cultivos de maíz. Casi medio siglo después, Civerolo y Keil (1969) usaron exitosamente varios tratamientos con fagos foliares para el control de *Xanthomonas pruni* en las plántulas de durazno.

Los fagos tienen ciertos atributos, tales como la actividad biológica que pueden ejercer en dilución (10^{-11}), sus propiedades antigénicas, la resistencia ante agentes físicos y químicos que se sitúa entre formas vegetativas y esporulantes de bacterias y una amplia diversidad que contradice la unicidad planteada por D'Herelle (Katznelson, 1937). Sin embargo, a pesar de los resultados promisorios, Okabe y Goto (1963) concluyeron que los fagos, en general, no son muy promisorios como estrategia de control de las enfermedades bacterianas debido a la posibilidad de que las bacterias muten y adquieran resistencia a dichos bacteriófagos.

En relación con esto, algunas cepas o especies bacterianas permanecen susceptibles a la acción de los fagos, mientras que otras desarrollan resistencia. Las primeras fueron denominadas *homogéneas*, mientras que a las que adquieren resistencia se les llamó *heterogéneas*, con el agravante de que las heterogéneas pueden aumentar su virulencia (Katznelson, 1937; Okabe & Goto, 1963). En paralelo con observaciones en humanos y en animales, Katznelson (1937) anticipó que pueden existir bacterias fitopatógenas heterogéneas cuyos fluidos inhiben la actividad de los fagos, o que estos pueden ser adsorbidos por células y tejidos.

Existen varios retos para mejorar las interacciones fago-bacteria: su limitado espectro de actividad

contra especies bacterianas específicas (Summers, 2005); la accesibilidad a la bacteria objetivo; el tiempo de aplicación del fago para optimizar su eficacia; la capacidad del fago para infectar y replicarse en el entorno de destino; la densidad de los fagos en el sitio de interacción (filósfera o rizosfera); las tasas de degradación del virión (el fago varía en las propiedades de degradación) y la humedad adecuada para promover la difusión de los fagos (Gill & Abedon, 2003), ya que es necesario que existan altas poblaciones de fagos en tiempos críticos para asegurar la interacción con la bacteria objetivo. Esto, frecuentemente, no es posible debido a su alta susceptibilidad a las condiciones medioambientales, tales como los rayos UVA y UVB, la temperatura ambiente, la desecación y los plaguicidas químicos, como los bactericidas a base de cobre, que son comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades bacterianas. La radiación solar es el factor más limitante para la sobrevivencia de los fagos (Iriarte et al., 2007).

Dado que las enfermedades producidas en las plantas a causa de las bacterias siguen siendo muy limitantes, se ha observado un resurgimiento de los estudios sobre la profilaxis y el tratamiento de fitopatógenos con fagos. Sin embargo, aunque se han estudiado múltiples sistemas en los que se han usado fagos y existen resultados promisorios (tabla 20.1), hay muy pocos bioplaguicidas disponibles a nivel comercial. Por lo tanto, para hacer un uso efectivo de los fagos se deben diseñar estrategias que permitan hacer frente a sus limitantes, como es el caso de ciertas formulaciones protectoras para prolongar su persistencia y su actividad en el campo.

Otra estrategia empleada para mantener altas poblaciones ha sido usar, como vectores, cepas bacterianas no patógenas o atenuadas que sean sensibles a los fagos y que permitan su liberación y propagación. De otra parte, la selección de fagos tolerantes a las condiciones ambientales deletéreas podría permitir que se escojan organismos adaptados a los sitios en los que serían aplicados. Adicionalmente, el uso efectivo de los fagos en campo requiere del monitoreo permanente de las cepas bacterianas patógenas para minimizar el desarrollo de cepas resistentes o la proliferación de cepas silvestres que no sean sensibles a los bacteriófagos que se utilizan.

Tabla 20.1. Ejemplos de fagos usados para el control biológico de bacterias fitopatógenas

Patógeno	Hospedante	Enfermedad	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tomate	Agalla de la corona	El bioensayo con bacteriófago de tejido infectado no tuvo efecto.
<i>Dickeya solani</i>	Papa	Podredumbre blanda	Se vio un pequeño efecto cuando el tubérculo semilla fue tratado con fago antes de la siembra.
<i>Erwinia amylovora</i>	Frutas de pepita	Tizón de fuego	Fagos aislados y caracterizados <i>in vitro</i> . Algunos ensayos <i>in planta</i> , con resultados prometedores en combinación con el vector no patógeno de <i>Pantoea agglomerans</i> .
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Cartucho o alcatraz	Pudrición blanda bacteriana	Hubo reducción de la carga bacteriana por fagos, pero la inhibición de la muerte fue causada por soluciones fertilizantes.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tabaco	Marchitez bacteriana	En pruebas en invernadero, el pretratamiento de las raíces con una cepa avirulenta y la aplicación de fagos protegieron a las plantas contra el marchitamiento bacteriano. No se realizó ninguna comparación con los métodos convencionales de control químico.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomate	Marchitez bacteriana	En un ensayo en invernadero, el pretratamiento de las plántulas de tomate con ϕ RSL1 evitó el marchitamiento bacteriano en todas las plantas; todas las plantas no tratadas se marchitaron. ϕ RSL1 inhibió el crecimiento de bacterias, pero no las eliminó completamente.
<i>Streptomyces scabies</i>	Papa	Sarna de la papa	El tratamiento con fago en los tubérculos antes de la siembra redujo la cobertura de la lesión de la costra.
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Frutas de hueso	Puntos bacterianos	La aplicación de fago a las hojas de melocotón antes de la infección resultó en una reducción de la enfermedad del 42% en comparación con un control no tratado. La aplicación de fago después de la infección no tuvo ningún efecto.
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	Cebolla	Tizón de la hoja por <i>Xanthomonas</i>	Los ensayos en campo e invernadero con el fago proporcionaron protección equivalente a la obtenida con cobre.
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignaeradiatae</i>	Frijol mungo	Mancha bacteriana de la hoja	El efecto sinérgico del fago y de la estreptomycinina sobre las semillas de frijol mungo redujo la infección en las plántulas.

(Continúa)

(Continuación tabla 20.1)

Patógeno	Hospedante	Enfermedad	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	Nogal	Tizón de nogal	En un ensayo de invernadero, el fago no sobrevivió en las hojas de nuez; el patógeno no fue incluido en las hojas.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i>	Melocotón	Manchas de hoja y fruto	En uno de cada tres huertos, se observó una reducción significativa de la enfermedad con la aplicación semanal de un solo fago.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate y pimiento	Manchas bacterianas	Estos estudios han conducido al desarrollo exitoso de un fago BCA (Omnilytics, 2018).
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Cítricos	Cáncer de los cítricos	Resultados mixtos en ensayos en invernaderos y viveros comparados con bactericidas de cobre.
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	Cítricos	Mancha bacteriana de los cítricos	Resultados mixtos en ensayos en invernaderos y viveros comparados con bactericidas de cobre.

Fuente: Adaptado de Frampton, Pitman y Fineran (2012)

Endófitos

Los endófitos pueden ser hongos, bacterias y actinomicetos que pasan todo o un periodo de su ciclo de vida colonizando los espacios simplásicos o apoplásicos de los tejidos vegetales asintomáticos vivos (Wilson, 1995). Pueden desempeñar muchos papeles beneficiosos importantes en el metabolismo y en la fisiología de la planta huésped, incluyendo la fijación de nitrógeno atmosférico (Dalton et al., 2004), la solubilización de fosfatos (Forchetti, Masciarelli, Alemano, Alvarez, & Abdala, 2007), la síntesis de hormonas de crecimiento (Hardoim, Van Overbeek, & Elsas, 2008), la degradación de compuestos tóxicos (Sheng, Chen, & He, 2008), la inhibición de hongos patógenos, de patógenos bacterianos (Van Buren, Andre, & Ishimaru, 1993) y de insectos plaga (Castillo & Sword, 2015; Vega et al., 2009).

Muchos endófitos están representados por las bacterias comunes del suelo (actinomicetes, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*), las cuales producen una

gama diversa de metabolitos secundarios, antibióticos y compuestos orgánicos volátiles para contrarrestar los efectos deletéreos de los patógenos. Además, los endófitos pueden contrarrestar los efectos adversos causados por estrés abiótico, como la salinidad (Ezra et al., 2004; Kloepper et al., 1999; Lodewyckx et al., 2002).

Es bien conocido que existe una gran diversidad biológica de hongos endofíticos y que tienen presencia desde las regiones templadas hasta las selvas tropicales, donde se distribuyen aproximadamente 300.000 especies de plantas hospedantes terrestres. Se sabe, además, que cada especie vegetal alberga una o más especies de hongos endofíticos que pueden desarrollarse asintomáticamente en diferentes tejidos sanos de plantas, incluyendo los tallos, las hojas y las raíces, y en el suelo. Se estima que hay más de un millón de especies de hongos endofíticos en la naturaleza (Faeth & Fagan, 2002), entre los cuales se encuentran las micorrizas

y los biocontroladores, tanto de enfermedades (es el caso de *Trichoderma* spp.) (Hosseyini-Moghaddam & Soltani, 2014; Mulaw, Druzhinina, Kubicek, & Atanasova, 2013) como de insectos plaga (es el caso de *Beauveria* y *Purpureocillium*) (Castillo & Sword, 2015).

Si se tiene en cuenta que la mayoría de microorganismos biocontroladores son muy sensibles a las condiciones medioambientales y que los tejidos internos de las

plantas les proporcionan un ambiente protector a los endófitos, que colonizan un nicho ecológico similar a los patógenos de las plantas (Hallmann, Quadt-Hallmann, Mahaffee, & Kloepper, 1997), el uso de estas bacterias y de hongos endófitos biocontroladores podría garantizar una respuesta de control consistente. En el capítulo 19 de este libro, “Los hongos endófitos en control biológico de fitopatógenos e insectos plagas”, se amplía este tema.

Bioestimulantes para mejorar la actividad de los microorganismos biocontroladores

En la literatura científica, el término *bioestimulante* fue definido por primera vez por Kauffman, Kneivel y Watschke (2007), y se refiere a los “materiales diferentes de los fertilizantes, que promueven el crecimiento de las plantas cuando se aplican en bajas cantidades” (traducción propia). Según Du Jardin (2015), un bioestimulante vegetal es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico o los rasgos de calidad de los cultivos, independientemente de su contenido de nutrientes. Por extensión, los bioestimulantes de plantas también designan productos comerciales que contienen mezclas de tales sustancias o microorganismos. Muchos bioestimulantes mejoran la nutrición, y lo hacen independientemente de su contenido de nutrientes. Los biofertilizantes, que se proponen como una subcategoría de los bioestimulantes, aumentan la eficiencia en el uso de nutrientes. En este sentido, los bioestimulantes microbianos incluyen hongos micorrízicos y no micorrízicos, endosimbiontes bacterianos (como *Rhizobium*), bacterias biofertilizantes no simbióticas y rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, a las cuales ya nos referimos. Por lo tanto, los microorganismos aplicados a las plantas pueden tener una doble función: como bioestimulantes y como agentes de biocontrol.

A continuación se mencionan algunos bioestimulantes definidos como sustancias beneficiosas para las plantas sin que sean nutrientes, plaguicidas o mejoradores del suelo.

Ácidos húmicos y fúlvicos

Los ácidos húmicos y fúlvicos (*humic substances* [HS, por la sigla en inglés]) son constituyentes naturales de la materia orgánica del suelo que resultan de la descomposición de residuos vegetales, animales y microbianos, pero también de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo que utilizan estos sustratos. Son compuestos heterogéneos que originalmente fueron clasificados de acuerdo con sus pesos moleculares y su solubilidad como huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Estos compuestos tienen una dinámica compleja de asociación y disociación en coloides supramoleculares que también es influenciada por las raíces de las plantas mediante la liberación de protones y exudados. Las sustancias húmicas y sus complejos en el suelo resultan de la interacción entre la materia orgánica, los microorganismos y las raíces de las plantas. La variabilidad de los efectos de los HS está relacionada con la fuente de la que son obtenidos, las condiciones ambientales, la planta receptora, la dosis y la forma de aplicación (Rose et al., 2014).

Hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen nitrógeno

Las mezclas de aminoácidos y péptidos se obtienen por hidrólisis química y enzimática de proteínas a

partir de subproductos agroindustriales, tanto de origen vegetal (residuos de cosecha) como de desechos animales (por ejemplo, colágeno y tejidos epiteliales) (Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014; Du Jardin, 2012; Halpern et al., 2015). Otras moléculas nitrogenadas incluyen betaínas, poliaminas y aminoácidos no proteínicos, que son heterogéneos y diversificados, pero poco caracterizados con respecto a sus roles fisiológicos y ecológicos (Vranova, Rejsek, Skene, & Formanek, 2011). La trimetilglicina, conocida como betaína, es un caso especial derivado de aminoácidos, ya que este compuesto posee propiedades antiestrés bien conocidas para las plantas (Chen & Murata, 2011).

Los bioestimulantes desempeñan múltiples funciones, ya que pueden actuar como promotores del crecimiento de las plantas (Calvo et al., 2014; Du Jardin, 2012; Halpern et al., 2015). Otros efectos directos en las plantas incluyen la modulación de la absorción y asimilación de N mediante la regulación de las enzimas involucradas en la asimilación de N y de sus genes estructurales, que actúan sobre la vía de señalización de adquisición de N por las raíces. Al regular las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (*tricarboxylic acid* [TCA por su sigla en inglés]) también contribuyen a la conversación cruzada entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno. A los hidrolizados de proteínas también se les han atribuido actividades hormonales (Colla, Rouphael, Canaguier, Svecova, & Cardarelli, 2014). Algunos aminoácidos (como la prolina) poseen efectos quelantes que pueden proteger las plantas contra el efecto de los metales pesados y también contribuyen a la movilidad y la adquisición de micronutrientes. La betaína, la glicina y la prolina contribuyen a la mitigación del estrés ambiental, pues poseen actividad antioxidante.

Los efectos indirectos sobre la nutrición y el crecimiento de las plantas también son importantes en la práctica agrícola cuando se aplican hidrolizados de proteínas a las plantas y al suelo. Se sabe que los hidrolizados de proteínas aumentan la biomasa microbiana y su actividad, mejorando así la respiración y la fertilidad del suelo. Se considera que las actividades quelantes de algunos aminoácidos y péptidos contribuyen a la disponibilidad de nutrientes y a su toma por las raíces (Du Jardin, 2015).

Extractos de algas marinas y plantas

El uso de algas frescas como fuente de materia orgánica y como fertilizante es antiguo en la agricultura, pero sus efectos bioestimulantes se han reportado recientemente. Los polisacáridos, como laminarina, alginatos y carragenanos y sus productos de descomposición, así como los esteroides, las betaínas y las hormonas contribuyen a la promoción del crecimiento vegetal (Craigie, 2011; Khan et al., 2009). La mayoría de las especies de algas pertenecen a los géneros de las algas pardas, como *Ascophyllum*, *Fucus* y *Laminaria*, pero los carragenanos provienen de las algas rojas. Más de veinte productos de algas utilizadas como bioestimulantes para el crecimiento de las plantas han sido enumerados por Khan et al. (2009) y por Craigie (2011). Estos pueden aplicarse en suelos, en cultivos hidropónicos o en tratamientos foliares. En los suelos, sus polisacáridos contribuyen a la formación de gel, la retención de agua y la aireación. Los compuestos polianiónicos contribuyen a la fijación y el intercambio de cationes, lo que también es de interés para la fijación de metales pesados y para la remediación del suelo.

También se describen efectos positivos a través de la microflora del suelo, con la estimulación de bacterias promotoras del crecimiento y de microorganismos antagonistas de fitopatógenos en suelos supresivos. En las plantas, proveen micro y macronutrientes que actúan como fertilizantes. Las consecuencias sobre la germinación de las semillas, el establecimiento de las plantas y su crecimiento y desarrollo están asociadas con los efectos hormonales, que se consideran como los principales causantes de la actividad de bioestimulación. Aunque las citoquininas, auxinas, ácido abscísico, giberelinas y otros compuestos como los esteroides y las poliaminas han sido identificados en extractos de algas (Craigie, 2011), se ha demostrado que los efectos hormonales de los extractos del alga marrón *Ascophyllum nodosum* se explican, en gran medida, por la regulación positiva de los genes de la biosíntesis de las hormonas en los tejidos de las plantas y, en menor medida, por los contenidos hormonales de los extractos de algas marinas (Wally et al., 2013a, 2013b).

Quitina, quitosán y otros biopolímeros

La quitina es un polímero de N-acetil-D-glucosamina unido por enlace $\beta(1,4)$ que tiene propiedades físico-químicas y biológicas de gran interés agrícola (Tharanathan & Kittur, 2003). Después de la celulosa, es el polisacárido más abundante en la naturaleza. Este biopolímero es el componente básico que les confiere resistencia mecánica a los organismos que la contienen, como es el caso de los insectos y los crustáceos, ya que constituye el principal componente del exoesqueleto. Además, forma parte de las paredes celulares de los hongos, las algas y los huevos de los nematodos (Cohen, 2001; De Jin et al., 2005; Gortari & Hours, 2008; Merzendorfer & Zimoch, 2003).

El quitosán es un polímero de β -1,4-glucosamina que hace parte esencial de la pared celular de los hongos y se puede obtener por desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de artrópodos (Winterowd & Sandford, 1995). Este es el aminopolisacárido más abundante de origen natural, no es tóxico, es bioactivo y posee características fisicoquímicas especiales que están relacionadas con su actividad biológica (Goy, Britto, & Assis, 2009; Rabea, Badawy, Stevens, Smagghe, & Steurbaut, 2003).

Debido a que la quitina y el quitosán no se encuentran presentes en las plantas y los vertebrados, se pueden utilizar de manera segura en el control de insectos plaga y de enfermedades (Cohen, 2001). Ambos biopolímeros tienen propiedades en el control de enfermedades debido a diferentes mecanismos indirectos y directos; en el primer caso, pueden estimular el desarrollo de microflora benéfica que actúa como biocontroladora (Badawy & Rabea, 2011; Tian, Riggs, & Crippen, 2000). Además, estimulan las defensas de las plantas, ya que inducen la biosíntesis de fitoalexinas (Ren & West, 1992; Yamada, Shibuya, Kodama, & Akatsuka, 1993), la activación de glucanasas y quitinasas (Kaku, Shibuya, Xu, Aryan, & Fincher, 1997; Roby, Gadelle, & Toppan, 1987), la biosíntesis de ácido jasmónico (Nojiri et al., 1996), la generación de especies reactivas de oxígeno (Kuchitsu, Kosaka, Shiga, & Shibuya, 1995), la expresión temprana de respuesta de genes relacionados con la

defensa (Minami et al., 1996; Nishizawa et al., 1999; Takai, Hasegawa, Kaku, Shibuya, & Minami, 2001), la lignificación (Barber, Bertram, & Ride, 1989), la despolarización de la membrana y fosforilación de proteínas, además de generar variaciones en el flujo de iones y acidificación citoplasmática (Barber et al., 1989; Felix, Baureithel, & Boller, 1998; Felix, Regenass, & Boller, 1993; Kikuyama, Kuchitsu, & Shibuya, 1997). Complementariamente, el quitosán inhibe la producción de proteinasas (Walker-Simmons & Ryan, 1984) e induce la formación calosa (Conrath, Domard, & Kauss, 1989; Köhle, Jeblick, Poten, Blaschek, & Kauss, 1985). El principal efecto directo de estos biopolímeros se centra en sus propiedades fungicidas o antimicrobiales (Badawy & Rabea, 2011; El Hadrami, Adam, El Hadrami, & Daayf, 2010; Goy et al., 2009; Rabea et al., 2003).

La adición de quitina o de quitosán como adyuvante para mejorar la eficacia de los microorganismos antagonistas y para inducir resistencia sistémica en la planta, ya sea solo o en combinación con agentes de control biológico, ha tenido éxito contra diversos patógenos del suelo y representa una alternativa viable para el manejo de enfermedades fúngicas (Benhamou, Kloepper, & Tuzun, 1998; El-Ghaouth, Arul, Ponnampalam, & Boulet, 1991; El-Ghaouth, Ponnampalam, Castaigne, & Arul, 1992). Su efecto sinérgico con agentes de control biológico fue demostrado por Algam et al. (2010) en la interacción *Paenibacillus polymyxa* – tomate – *Ralstonia solanacearum* y *Trichoderma harzianum* – tomate – *F. oxysporum*, en donde la concentración de quitosán de 0,5 a 4 g.L⁻¹ disminuyó significativamente el crecimiento del patógeno e inhibió totalmente a la concentración de 4 g.L⁻¹. En condiciones de invernadero, la aplicación de *T. harzianum* y quitosán (1 g.L⁻¹), como tratamiento de inmersión de la raíz, redujo la incidencia de la enfermedad en un 66,6% (El-Mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014). Estos compuestos se utilizan en la agricultura, en forma de polímeros y de oligómeros de tamaños variables.

Los efectos fisiológicos de los oligómeros del quitosán en las plantas son el resultado de la capacidad de este compuesto policatiónico de unirse a una amplia gama de componentes celulares, incluyendo el ADN, la membrana plasmática y los constituyentes de la pared celular,

además de unirse a receptores específicos implicados en la activación de los genes de defensa (El Hadrami et al., 2010; Hadwiger, 2013; Katiyar, Hemantaranjan, & Singh, 2015; Yin, Zhao, & Du, 2010). La quitina y el quitosán usan aparentemente distintos receptores y vías de señalización. Entre los efectos celulares de la unión del quitosán a los receptores celulares más o menos específicos, se ha demostrado la acumulación de peróxido de hidrógeno y la fuga de Ca^{2+} en la célula, lo que causa cambios fisiológicos, ya que estos tienen un rol clave en la señalización de las respuestas al estrés y en la regulación del desarrollo. El análisis del proteoma (Ferri, Franceschetti, Naldrett, Saalbach, & Tassoni, 2014) o del transcriptoma (Povero et al., 2011) de tejidos vegetales tratados con quitosán confirmaron esta suposición. Aunque el uso de este compuesto se ha centrado en la protección de las plantas contra los patógenos, sus usos agrícolas podrían ser más amplios, ya que le confieren a la planta tolerancia al estrés abiótico (sequía, salinidad y estrés por el frío). El cierre estomático inducido por el quitosán a través de un mecanismo dependiente del ácido abscísico (ABA) participa en la protección del estrés ambiental conferida por este bioestimulante (Iriti et al., 2009).

Otros polímeros y oligómeros de origen biológico se utilizan en la agricultura como elicitores, como en el caso de la laminarina, un glucano de almacenamiento de las algas marrones. Aunque debe hacerse una distinción entre el biocontrol y la bioestimulación, las vías de señalización pueden estar interconectadas y ambos efectos pueden, prácticamente, resultar de la aplicación de los mismos inductores (Gozzo & Faoro, 2013).

En conclusión, los bioestimulantes pueden ejercer múltiples funciones, ya que pueden mejorar la resistencia de las plantas a las perturbaciones ambientales al ejercer efectos directos sobre esta o sobre los microorganismos benéficos del suelo. Sin

embargo, aún falta mucha investigación para definir las dosis, las técnicas de aplicación y las especificidades para producir mayor impacto en la protección contra el estrés. Además, debe darse una alta prioridad a la mejor comprensión de sus efectos funcionales y sus mecanismos, ya que solo así se podrá pasar a la próxima generación de bioestimulantes en la cual las sinergias y los mecanismos complementarios puedan ser diseñados funcionalmente. Se ha propuesto un enfoque integral y sistemático para descubrir y caracterizar los nuevos bioestimulantes y comprender su modo de acción, utilizando un enfoque combinado que abarque la biología, la química y las ómicas. Los metaanálisis podrían ayudar a encontrar nuevos efectos de los bioestimulantes y sus los factores sinérgicos y complementarios; así, se podrían desarrollar formulaciones específicas de agentes de control biológico con bioestimulantes dirigidas a mejorar la respuesta de la planta tanto al estrés biótico como abiótico. Por ejemplo, para mejorar la resiliencia de las plantas en condiciones de sequía, los bioestimulantes podrían estimular el crecimiento de las raíces y el desarrollo de brotes, lo que les permitiría explorar la capa de suelo más profunda durante la temporada de sequía y estimular la síntesis de solutos compatibles para restablecer gradientes potenciales y absorción de agua cuando esta disminuya en el suelo. Ciertos efectos positivos pueden ser producidos por los bioestimulantes microbianos, que crean superficies de absorción alrededor de los sistemas radicales y secuestran el agua del suelo para favorecer las plantas. Los bioestimulantes también podrían usarse simultáneamente para estabilizar o mejorar la actividad de los microorganismos biocontroladores y para estimular las respuestas de defensa de las plantas, mejorando así la salud vegetal; esto generaría una mayor tolerancia ante los diferentes fitopatógenos e insectos que amenazan a un cultivo determinado.

Aplicaciones del microbioma presente en distintos tejidos de la planta

Una de las observaciones interesantes derivada de los estudios de diversidad molecular es que los órganos en las plantas —por ejemplo, la rizosfera (raíces), la filósfera (zona aérea), la endósfera (tejidos internos)

y la carpósfera (frutos)— están colonizados por microorganismos, y los distintos tejidos parecen favorecer el reclutamiento de comunidades microbianas variadas. 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/cm en la superficie de las hojas y de 10^6 a 10^9 células/g en la rizosfera (Whitman et al., 1998); estos ensamblajes de comunidades no son producto del azar y parecen estar determinados por la anatomía de las hojas y las raíces y por la producción de exudados en estos tejidos (Berg, Rybakova, Grube, & Koberl, 2016).

La rizosfera se caracteriza por su alta abundancia microbiana (Berg, Eberl, & Hartmann, 2005) y es, tal vez, uno de los ambientes más estudiados, en parte porque los microorganismos presentes en la raíz promueven un mejor aprovechamiento de los nutrientes y pueden proteger la salud de la planta y evitar 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 por medio de metodologías como el enriquecimiento isotópico (Haichar et al., 2008) y por la comparación por secuenciación de 16S rARN de las comunidades microbianas, que señalan que solo una fracción de la comunidad presente en el suelo es capaz de habitar las raíces (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012). En la misma dirección, la localización espacial de los microorganismos en la raíz y su relación con la distribución de nutrientes ha sido demostrada por microscopía, por medio de metodologías como la FISH (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012; Ofek, Hadar, & Minz, 2012). Esta colocalización de nutrientes señala que las asociaciones entre la raíz y los microorganismos se dan por comunicación química, y en esta se involucran la acumulación de mucílago, los metabolitos secundarios exudados con la capacidad de atraer o repeler microorganismos (Badri & Vivanco, 2009), e incluso los mecanismos de defensa (Doornbos, Van Loon, & Bakker, 2012).

Estos mecanismos de comunicación y reclutamiento del microbioma parecen ser especie-específicos, como se observó en estudios comparativos de la diversidad de la rizosfera de dos plantas medicinales cultivadas en suelos adyacentes con las mismas condiciones donde, a pesar de su proximidad, 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 (Koberl, Schmidt, Ramadan, Bauer, & Berg, 2013). Adicional

a 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, la cual es fundamental para el funcionamiento y el ciclaje de los nutrientes (Berg, Grube, Schlöter, & Smalla, 2014).

En comparación con la rizosfera, la abundancia microbiana en la filósfera es menor debido a que las hojas son un ambiente más dinámico, con un menor tiempo de vida que las raíces, un menor número de nutrientes y con 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 un 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 que se forman principalmente en las uniones de las células epidérmicas, a lo largo de las venas y en las bases de los tricomas (Lindow & Brandl, 2003).

La colonización y el establecimiento del microbioma de la filósfera están determinados por las condiciones ambientales y biológicas. Un estudio conducido durante el periodo de crecimiento (julio-agosto) de cultivos de frijol, soya y canola muestra que durante esta etapa las variables climatológicas de las estaciones influyen sobre la composición y la maduración del microbioma de la filósfera (Copeland, Yuan, Layeghifard, Wang, & Guttman, 2015). Al principio, la composición del microbioma se ve fuertemente influenciada por los microorganismos del suelo; sin embargo, a medida que transcurre la temporada, la comunidad se vuelve menos diversa y más específica, con presencia de microorganismos como los de la familia Methylobacteraceae que comúnmente se encuentran asociados a la filósfera. Otro estudio reciente, esta vez en 57 especies de árboles en bosques neotropicales, muestra la relación de la microbiota asociada a la filósfera con los atributos biológicos de los árboles (Kembel et al., 2014). En este caso se encontraron asociaciones 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, debido, posiblemente, a que estos 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. Estos estudios muestran la complejidad de las fuerzas que modulan el establecimiento del microbioma de la filósfera y que tanto los factores bióticos como los abióticos deben ser evaluados en futuros estudios para dilucidar las fuerzas que determinan su composición y su dinámica.

Otra área de trabajo en la investigación de la microbiota se enfoca en el estudio de los frutos o la carpósfera. 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 en distintas partes del fruto y su relación con las prácticas de manejo orgánico y convencional (Abdelfattah, Wisniewski, Droby, & Schena, 2016). Se evaluaron las frutas poco después de la compra (T1) y después de dos semanas de almacenamiento (T5). Los análisis de diversidad revelaron poblaciones significativamente diferentes en las manzanas orgánicas y en las convencionales, y este resultado fue consistente en todas las partes de la fruta que fueron analizadas (extremo del cáliz, cáscara, extremo del pedúnculo y carne herida). Los resultados de este estudio representan un avance de los conocimientos actuales sobre la microbiota de los hongos en los tejidos de la fruta y muestran la importancia del manejo para 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 poscosecha.

A pesar de la ubicuidad de los microbiomas asociados a los distintos tejidos y su posible rol en la salud de las plantas, la mayoría de los estudios sobre control biológico se han enfocado principalmente en el entendimiento de interacciones simples planta-

patógeno y planta-patógeno-agente controlador. Aunque estas aproximaciones han permitido entender múltiples mecanismos de control de enfermedades y seleccionar microorganismos, el 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 impulsar el uso de agentes biológicos sobre compuestos químicos que muchas veces son nocivos para el medioambiente.

Se han propuesto varias aproximaciones que permitirían aprovechar el uso del conocimiento del microbioma en el área del control biológico. Una estrategia de prevención busca dilucidar si las interacciones microbiota-patógeno-planta, como 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 la colonización del patógeno y favorecer 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. Estos suelos, denominados *supresivos* (es decir, que impiden el desarrollo de enfermedad), han sido reportados alrededor del mundo y en muchos casos existe una clara evidencia de la contribución de la microbiota en estos resultados. Existen, principalmente, dos tipos de supresividad: el primero, la supresividad general, debida al efecto de la biomasa total de microorganismos, y el segundo, 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 (cuando los microorganismos del suelo inhiben el establecimiento del patógeno) y la supresividad indirecta (cuando el microbioma estimula el sistema inmune de la planta) (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

La existencia de suelos con comunidades supresivas ha sido reportada para múltiples cultivos como papa y manzana. Por ejemplo, a 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 que llevaban menos de quince años. En el estudio de Menzies (1959) 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 abrieron la puerta para otros trabajos que han demostrado la importancia del factor microbiológico del suelo en el desarrollo de las enfermedades. Weller et al. (2002) presentan una revisión completa de la historia de la supresividad. Un estudio más reciente en remolacha demostró, por medio de técnicas dependiente e independiente de cultivo, que los microorganismos de la clase gamma-proteobacteria presentes en la rizosfera presentan una clara actividad supresiva contra el patógeno *Rhizoctonia solani* (Mendes, 2012).

A pesar de la evidencia de la presencia de comunidades supresivas, delimitarlas y aprovecharlas propone importantes retos tecnológicos y de conocimiento, ya que es imposible recuperar estas comunidades complejas y megadiversas en los cultivos. 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 recolectada por Agler et al. (2016) en su estudio sobre *Arabidopsis thaliana* sugiere que para favorecer o suprimir el desarrollo de enfermedades no son necesarios todos los organismos de la comunidad, ya que la presencia de algunas especies clave puede conducir al establecimiento de los demás

microorganismos. En la misma línea, algunos autores sugieren que inocular microorganismos colaboradores clave (cepas auxiliares) junto con los biocontroladores puede aumentar su 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 potencialicen la eficacia de los agentes biocontroladores. En el capítulo 4 sobre “Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos” se profundiza sobre este tema.

Elicitores

Según Goyal, Lambert, Cluzet, Mérillon y Ramawat (2012), los elicitores son factores físicos o químicos que estimulan una respuesta de defensa en la planta. Los primeros, cuando se utilizan en pequeñas dosis, le generan estrés a la planta y esto desencadena la producción de moléculas de señalización, en tanto que las sustancias químicas elicitoras son reconocidas mediante receptores específicos presentes en las células vegetales. que, en pequeñas concentraciones, desencadenan efectos morfológicos y fisiológicos. Los elicitores se pueden dividir en dos tipos: bióticos y abióticos. Los elicitores abióticos son factores físicos o sustancias tales como las sales orgánicas, mientras que los elicitores bióticos se derivan de microorganismos (hongos, bacterias, virus) o son componentes de la pared celular de la planta. Los elicitores bióticos también incluyen productos químicos liberados por las plantas contra fitopatógenos o por el ataque de herbívoros (Namdeo, 2007). Estos pueden ser polisacáridos, productos derivados de las paredes de las células vegetales (pectina o celulosa), de gomas de plantas y de microorganismos (quitina o glucanos) y glicoproteínas o proteínas intracelulares cuyas funciones están acopladas a receptores que actúan activando o inactivando una serie de enzimas o canales de hierro (tabla 20.2). Por lo tanto, los elicitores se pueden dividir en función de su fuente como *exógenos* y

endógenos. Los primeros se originan en el patógeno, en microorganismos benéficos o en otros agentes externos y, en su mayoría, tienen movilidad dentro de los tejidos vegetales. Los elicitores endógenos son de origen vegetal y se producen como resultado de la interacción con el patógeno o con otros microorganismos.

Los microorganismos de la rizosfera, como las PGPR y algunas cepas de *Trichoderma* spp., pueden actuar como elicitores bióticos, ya que tienen el potencial de inducir la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Por ejemplo, al estudiar el efecto de las PGPR *P. putida* (PP-168) y *P. fluorescens* (PF-187) en la raíz

de *Hyoscyamus niger* se observó un aumento en el tamaño de los brotes y un aumento de dos alcaloides: tropano hyoscyamine (HYO) y escopolamina (SCO) (Ghorbanpour, Hatami, & Khavazi, 2013). En otros trabajos se ha encontrado que los lipopéptidos surfactina y fengicina, producidos por especies de *Bacillus* spp., también pueden actuar como elicitores, ya que estimulan las defensas de la planta (Raaijmakers, De Bruijn, Nybroe, & Ongena, 2010).

En estudios sobre frijol, las fengicinas y las surfactinas purificadas proporcionaron una protección significativa contra *Botrytis cinerea* mediada por resistencia sistémica

Tabla 20.2. Ejemplo de elicitores bióticos de uso común

Ácido araquidónico	Oligómeros de alginato
Ácido eicosapentaenoico	Oligómeros de alginato
Ácido péctico	Pectina
<i>Alteromonas macleodii</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> , <i>Phytophthora cryptogea</i> y <i>Phytophthora sojae</i>
<i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus sojae</i>	Piezas de corcho exógeno
<i>Botrytis cinerea</i>	Poliaminas
Celulosa	Pol-L-lisina
<i>Colletotrichum trifolii</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
Crudo de algas verde azules	Quitosán
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>Enterobacter sakazaki</i>	<i>Rhizoctonia bataticola</i>
Extracto de cuscuta	<i>Rhizoctonia solani</i>
Flagelina	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
Glicoproteínas	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Glucanos	<i>Streptomyces melanosporofaciens</i> Syringolide
Glucomanosa	Systemina
Harpines	<i>Trichoderma viride</i>
Hemicelulasa	Ulva
Hepta- β -glucósidos	<i>Verticillium dahliae</i>
Laminarina	Volicitina (linolenilo N-L-glutamina)
Monilicolina	Elicitor de levadura

Fuente: Adaptada de Goyal et al. (2012)

inducida (*induced systemic resistance* [ISR por la sigla en inglés]). Este efecto contra el fitopatógeno fue similar al inducido por células vivas de la cepa productora de estos lipopéptidos *B. amyloliquefaciens* S499 (Ongena et al., 2007). De otra parte, Chowdhury et al. (2015) encontraron un incremento dramático en la expresión del gen de la defensina 1.2 (PDF1.2) cuando aplicaron células de la cepa de *B. amyloliquefaciens*.

Algunos hongos benéficos, tales como *Trichoderma* spp., también pueden inducir diferentes tipos de respuestas de defensa, una de ellas, mediante la activación de la ruta de los terpenoides con la consecuente producción de fitoalexinas. Esto se observó en plántulas de algodón en las que se relacionó esta inducción con el control de *Rhizoctonia solani* (Howell, Hanson, Stipanovic, & Puckhaber, 2000). Este hongo también induce respuestas de defensa relacionadas con la expresión de proteínas PR, que tienen efecto en la supresión local y sistémica de la enfermedad (Keswani, Mishra, Sarma, Singh, & Singh, 2014; Vinale et al., 2008). Cotes, Lepoivre y Semal (1996) demostraron, en plántulas de frijol, altos niveles de endoquitinasas y endo- β -1,3-glucanasas de origen vegetal cuando las semillas eran tratadas antes de la siembra con *Trichoderma koningiopsis*, respuesta que estuvo relacionada con el control de *Pythium splendens*. Este mismo microorganismo estimuló respuestas de resistencia sistémica relacionadas con la expresión de ácido jasmónico y etileno en ensayos efectuados en tomate contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Moreno et al., 2009). En algodón, el tratamiento con *Trichoderma virens*, además de fitoalexinas, estimuló la actividad POX (Djonović, Pozo, Dangott, Howell, & Kenerley, 2006; Djonović et al., 2007). De otra parte, en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con la cepa T22 de *T. harzianum* se encontró una elevada expresión del gen de NPR1 relacionada con el control de *Pythium ultimum* (Shoresh, Harman, & Mastouri, 2010).

Estas respuestas de defensa de la planta se activan por el metabolismo de la ruta de los fenilpropanoides (PP) en la que la fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza el primer paso importante del metabolismo general de los PP; de este modo se produce la síntesis de los compuestos que tienen un rol indispensable en la defensa, como los involucrados en el fortalecimiento y

la reparación de la pared celular (suberina y lignina), los que tienen actividad antimicrobiana (fitoalexinas tipo isoflavonas) y la señalización del ácido salicílico (SA) (Hammerschmidt, 1999).

Otros hongos benéficos como la micorriza *Piriformospora indica* también han sido reportados por inducir respuestas de defensa en las plantas contra patógenos del suelo mediada por el ácido jasmónico (JA) (Serfling, Wirsal, Lind, & Deising, 2007; Stein, Molitor, Kogel, & Waller, 2008).

De otra parte, dándole sustento a los beneficios relacionados con el uso de consorcios microbianos, se encontró que una mezcla de *Trichoderma*, *Bacillus* y *Rhizobium* spp. estimuló el sistema de defensa mediado por el ácido jasmónico JA en garbanzo ante la presencia *S. rolfii* (Singh, Sarma, Upadhyay, & Singh, 2013). Resultados similares de inducción de la resistencia en arveja fueron reportados por Jain, Singh, Singh y Singh (2015) cuando usaron una mezcla de *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. contra *S. sclerotinia* y encontraron un incremento significativo de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas (Mishra, Tewari, Singh, & Kumar, 2015).

Los elicitores bióticos y abióticos tienen un gran potencial en la fitoprotección. Sin embargo, se requiere de un mejor conocimiento sobre los procesos de elicitación. De esta forma, se podría lograr una reducción en la aplicación de fungicidas y en las dosis requeridas para el control de enfermedades (Baider & Cohen, 2003), o podrían usarse junto con bioplaguicidas dentro de una estrategia de manejo integrado de enfermedades. Esto ha demostrado ser efectivo en el control de diferentes enfermedades, como en el caso de las pudriciones en la poscosecha causadas por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en frutos de kiwi: al combinar una levadura antagonista, *Candida diversa*, con el tratamiento con harpinas, que son proteínas que actúan como elicitores, se estimuló una respuesta hipersensible que permitió el control efectivo de ambas enfermedades. Esto demostró la inducción de la actividad de enzimas implicadas en la respuesta de defensa, tales como polifenol oxidasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, además del aumento en el contenido de lignina en los kiwis (Tang et al., 2015).

RNAi: nueva estrategia de control de fitopatógenos basada en silenciamiento génico

A partir de la última década del siglo xx, los avances en las metodologías de investigación sobre los sistemas biológicos posibilitaron un incremento fundamental del conocimiento sobre su constitución y su funcionamiento. El auge de las disciplinas ómicas nutrieron diferentes ramas de la ciencia y generaron nuevas y revolucionarias aplicaciones en agricultura. Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (*high throughput*), se encuentran disponibles los genomas de cientos de microorganismos fitopatógenos en las bases de datos. Esto, sumado a la información generada en estudios de genómica estructural, constituye una fuente para la predicción *in silico* de genes vitales o relacionados con la patogenicidad y la virulencia de los fitopatógenos. Esta información se puede traducir en una estrategia para combatir agentes causales de enfermedades en plantas, en lo que se cataloga como *resistencia derivada del patógeno* o PDR (por la sigla en inglés de *pathogen-derived resistance*) (Panwar et al., 2016).

La investigación en genómica funcional de virus, hongos y bacterias fitopatógenas se ha valido de mecanismos de silenciamiento génico mediado por ARN, también conocido por *ARN de interferencia* o ARNi (Meena, Verma, & Kumhar, 2017). Este mecanismo, inicialmente, se aplicó como herramienta para caracterizar y validar funciones biológicas de genes que revelaron candidatos de patogenicidad y virulencia, y posteriormente, debido a su alto potencial en el desarrollo de estrategias de costo efectivas, ofreció nuevas oportunidades para acelerar los esfuerzos de control de fitopatógenos mediante el ataque de genes específicos esenciales para su supervivencia (Fondong, Nagalakshmi, & Dinesh-Kumar, 2016).

ARN de interferencia

El ARNi es un mecanismo de regulación genética, evolutivamente conservado en eucariotas, el cual es activado por la presencia de moléculas de ARN de doble cadena (dcARN), de tipo endógeno o exógeno, en el

citoplasma de la célula. La consecuencia de su accionar es la hidrólisis específica de secuencias homólogas al dcARN efector, el cual participa en la identificación y la posterior destrucción de la secuencia específica blanco. Este mecanismo sirve para eliminar transcripciones de ARN mensajero (ARNm) foráneo de una manera específica en la secuencia de nucleótidos antes de que generen proteínas dañinas o invadan el genoma, por lo cual posee enormes potencialidades biotecnológicas (Groszhans & Filipowicz, 2008) (figura 20.5).

El descubrimiento del ARNi es uno de los mayores avances científicos de las últimas décadas y se ha descrito como cosupresión homóloga, *quelling* o silenciamiento génico postranscripcional PTGS (por la sigla en inglés de *post-transcriptional gene silencing*) o *knock-down* génico.

Antecedentes

En 1987, se reportó por primera vez el mecanismo de silenciamiento génico en la enzima nopalina sintasa (NOS) en plantas de tabaco, lo cual se evidenció por la pérdida de actividad en la enzima y su correspondiente señal en un *northern blot* (Rothstein, DiMaio, Strand, & Rice, 1987). Posteriormente, en plantas de petunia, se observó que las secuencias antisentido del gen de la enzima chalcone sintasa (CHS), la cual hace parte de la vía de síntesis de flavonoides, generaban pérdida de pigmentación en los pétalos (Van der Krol et al., 1988). En un intento por aumentar la pigmentación de las petunias mediante la sobreexpresión del gen CHS, se observó un efecto contrario debido a la inhibición postranscripción de la expresión del gen por la vía de degradación del ARNm (Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990; Van der Krol, Mur, Beld, Mol, & Stuitje, 1990). Este fenómeno fue denominado *cosupresión* y su mecanismo fue desconocido por muchos años. Posteriores investigaciones fueron realizadas para describir el mismo mecanismo en otros organismos como hongos (*Neurospora crassa*) (Romano &

Macino, 1992), nematodos (*Caenorhabditis elegans*) (Guo & Kemphues, 1995), insectos (*Drosophila melanogaster*) (Pal-Bhadra, Bhadra, & Birchler, 1997) y protozoos (*Trypanosoma brucei*) (Ngo, Tschudi, Gull, K. & Ullu, 1998). Los investigadores Fire et al. (1998) lograron definir las características moleculares del proceso de interferencia en la expresión de los genes, denominado formalmente *ARN interferente* (ARNi), trabajo que fue reconocido con el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en el 2006.

Funcionamiento

Se han estudiado en detalle las proteínas asociadas al mecanismo de silenciamiento en diferentes organismos, donde se han descrito nuevas proteínas involucradas en sistemas específicos. Sin embargo, el funcionamiento general del mecanismo de ARNi requiere unos componentes fundamentales: a) una molécula desencadenante, que es dcARN, la cual activa el mecanismo; sin embargo, otros inductores que incluyen isoformas y modificaciones de ARN como micro ARN (miARN) y ARN interferentes pequeños (siARN) actúan posteriormente; b) una proteína procesadora denominada *Dicer* o *Dicer-like* (DLC); c) los productos del procesamiento, que son ARN de tamaño pequeño, siARN o miARN; d) un complejo efector compuesto por ribonucleoproteínas denominado *complejo de silenciamiento RISC* (*RNA-induced silencing complex*), cuya principal proteína es AGO o argonauta; e) una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (*RNA-dependent RNA polymerase*) que contribuye a amplificar la señal de inducción del mecanismo mediante la generación de ARN secundarios (Singh et al., 2016).

El mecanismo de ARNi inicia cuando la enzima *Dicer* reconoce los dcARN y los corta en pequeños fragmentos de doble cadena (aprox. 19-25 pb) denominados *siARN* en el citoplasma. Luego, los dcARN se separan en dos hebras y generan ARN de cadena sencilla (csARN); una hebra se denomina *pasajera* (la cual se degrada) y la otra hebra se denomina *guía*. La hebra guía se inserta en el complejo RISC que tiene actividad de digestión enzimática. Aunque en este complejo el actor principal es la proteína argonauta (AGO), se han descrito otras proteínas efectoras del complejo que

reconocen los ARNdc y estimulan la actividad *Dicer*. Este complejo RISC activado con la hebra guía es el que desarrolla la estrategia de silenciamiento de genes, en la cual identifica y captura el ARNm en el citoplasma de la célula y lo corta para disminuir su vida media y evitar su traducción.

Aunque no es completamente claro cómo la hebra guía en el complejo RISC se une a su ARNm blanco, se conoce que es un proceso específico de secuencia. El extremo 5' de la hebra guía está implicado en la adaptación y unión del ARNm diana, mientras que el extremo 3' localiza el ARNm en el sitio favorable para su corte por RISC. Una vez que el ARNm blanco es identificado y capturado, el proceso entero se desencadena por la amplificación del proceso de clivaje a través de la síntesis de dcARN adicionales a partir de los fragmentos de ARNm digeridos inicialmente. Por otra parte, el ARN guía también puede ser amplificado por la acción de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRP), lo cual da lugar a la generación secundaria de moléculas de dcARN que, a su vez, pueden conducir a la formación de nuevas moléculas de siRNA que mejoran y propagan sistemáticamente la degradación del ARNm objetivo en el citoplasma (figura 20.5) (Singh et al., 2016).

Aplicaciones

Existen diversas estrategias para reducir las pérdidas causadas por enfermedades, y entre ellas está el desarrollo de plantas resistentes a diferentes fitopatógenos. Debido a que las plantas utilizan el mecanismo de ARNi para controlar la progresión de las infecciones por patógenos de forma natural (Szittyá & Burguán, 2013; Tenllado, Llave, & Díaz-Ruiz, 2004), en las últimas dos décadas el silenciamiento por ARN se ha utilizado para generar cultivos resistentes (Duan, Wang, & Guo, 2012).

Con base en el mecanismo denominado *silenciamiento génico inducido por el hospedero* o HIGS (por la sigla en inglés de *host induced gene silencing*), se han desarrollado diversos enfoques de control, entre los cuales está la generación de plantas transgénicas que presentan inmunidad contra el patógeno mediante la

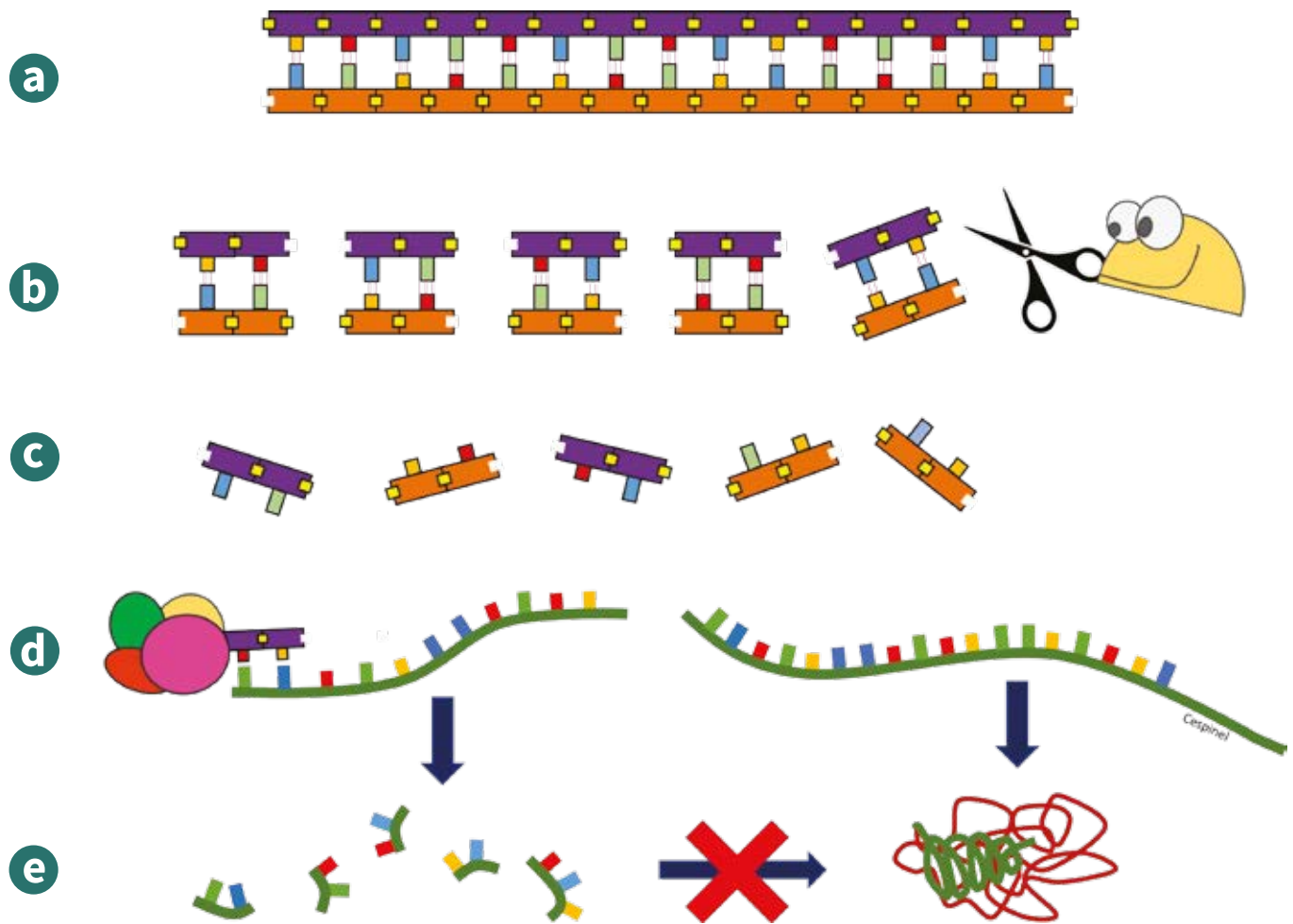


Figura 20.5. Mecanismo general de ARN interferente. a. Molécula desencadenante, generalmente ARNdc en el citoplasma celular; b. Fragmentación del ARNdc por una proteína procesadora denominada *Dicer* o *Dicer-like*; c. Productos del procesamiento ARNs de tamaño pequeño, donde se separan la hebra guía y la hebra pasajera; d. Conformación de complejo efector RISC (*RNA-induced silencing complex*) con su proteína argonauta (AGO) y selección de la hebra guía; reconocimiento específico del ARNm por RISC cargado con el RNA; e. Acción del complejo RISC para atacar e hidrolizar el ARNm diana, evitando así su traducción y formación de proteína.

Fuente: Elaboración propia

expresión endógena de dcARN. Bajo esta estrategia ampliamente estudiada, inicialmente se desarrollaron variedades vegetales resistentes a los virus patógenos, que imitan los mecanismos antivirales naturales de silenciamiento del ARN (Kusaba, 2004), y durante la última década se desarrollaron transgénicos para el control de hongos, nematodos e insectos (Huang, Allen, Davis, Baum, & Hussey, 2006; Mao et al., 2007; Nowara et al., 2010; Nunes & Dean, 2012).

Debido a las limitantes que existen para el desarrollo de plantas transgénicas, como la carencia de protocolos de transformación estandarizados para muchos

cultivos de importancia comercial, la inestabilidad de las características transformadas y la preocupación sobre el uso de organismos genéticamente modificados (OGM), se desarrolló otro enfoque de control con la aplicación del mecanismo HIGS (Wang & Jin, 2017). Esta nueva estrategia utiliza la síntesis de moléculas de dcARN y siARN exógenas *in vitro* o *in vivo* en sistemas alternativos para su posterior administración en los cultivos (Wang, Thomas, & Jin, 2017).

En este sentido, los conceptos de tráfico de ARN entre organismos de reinos cruzados y el ARNi ambiental son fundamentales para la aplicación de HIGS de

forma tópica. El primer concepto implica que las moléculas de ARNi se pueden movilizar e interactuar entre una planta hospedera y sus correspondientes patógenos o parásitos (Knip, Constantin, & Thordal-Christensen, 2014), y este tráfico permite la aplicación de estrategias de protección basadas en HIGS. El segundo concepto implica que las moléculas de ARN externas pueden inducir el mecanismo de ARNi y se denominan *moléculas de ARN ambiental* (Wang et al., 2017). Teniendo en cuenta estos dos conceptos, varios trabajos han demostrado que los dcARN y sARN que tienen como blanco secuencias de patógenos se pueden aplicar tópicamente para el control de enfermedades producidas por virus y hongos (Koch et al., 2016; Mitter et al., 2017; Wang et al., 2016). Esta estrategia ha sido denominada *silenciamiento génico inducido por atomización* o SIGS (por la sigla en inglés de *spray-induced gene silencing*). En el caso de *Fusarium graminearum*, se observó que la aplicación tópica de moléculas de dcARN dirigidas contra genes del patógeno generó la reducción de la enfermedad en las hojas de cebada, la cual se extendió a hojas que no fueron expuestas y sugirieron que las señales de interferencia se esparcen a partes distales de la planta.

Lo anterior se demostró al observar ARN fluoromarcados en xilema, parénquima del floema, células del mesófilo, tricomas y estomas (Koch et al., 2016). Resultados similares se observaron con la estrategia de aplicación tópica de moléculas de ARNi dirigidas contra *Botrytis cinerea* para el control del moho gris (Wang et al., 2016). De acuerdo con lo anterior, la estrategia de SIGS tiene gran potencial para la protección contra patógenos de productos poscosecha durante el procesamiento, el transporte y el almacenaje, incluyendo aquellos hongos que pueden producir micotoxinas perjudiciales para la salud del consumidor (Majumdar, Rajasekaran, & Cary, 2017).

Las estrategias de SIGS requieren un sistema de liberación en campo, como cualquier otra estrategia de control biológico. Las moléculas de ARNs desnudas pueden ser lábiles a las condiciones ambientales, por lo cual es necesario formularlas para su liberación. Los recientes avances en nanotecnología han mejorado el potencial de los SIGS para el control de patógenos en los cultivos. En una publicación reciente, se describe un sistema de formulación de los ARNs mediante su incorporación en nanopartículas denominadas *BioClay* (Mitter et al., 2017), cuya protección previno la degradación por ARNasas y por luz solar, además de proteger contra el lavado de las hojas con agua. Este trabajo demostró que la aplicación de ARNdc formulado en las hojas protegió la planta de la infección por virus (Mitter et al., 2017).

La aplicación de los SIGS es específica y ambientalmente segura, con baja probabilidad de que los patógenos desarrollen mecanismos de resistencia, y su uso podría ser más aceptado que el de OGM (Wang & Jin, 2017).

Consideraciones finales

El ARNi se convirtió en una herramienta altamente eficaz para silenciar la expresión génica de diversos patógenos que afectan los cultivos. El enfoque de SIGS abre nuevas puertas a una infinidad de aplicaciones biotecnológicas para la protección de cultivos, que además es respetuosa con el medioambiente. Esta estrategia puede ser aplicada mezclando múltiples secuencias blanco para el control de diversos patógenos. Muchas de las aplicaciones de ARNi son evaluadas actualmente para su comercialización o se encuentran en producción comercial.

Conclusiones y perspectivas

Es bien conocida la importancia de los microorganismos biocontroladores para mantener la sostenibilidad de los agroecosistemas. Sin embargo, a pesar de los progresos en esta materia, aún quedan muchos desafíos para responderle a las necesidades de los agricultores. Es necesario desarrollar nuevas estrategias para el control de enfermedades que aún no cuentan con estrategias biológicas de manejo y también es importante aumentar los niveles de control hasta ahora obtenidos en muchos patosistemas para garantizar una mayor consistencia y lograr beneficios adicionales al simple manejo de enfermedades (biofertilización, biorremediación, mayor espectro de control, etc.). Aunque se han estudiado varias facetas de las interacciones entre la planta, los microorganismos biocontroladores y otros componentes (bioestimulantes, elicitores, etc.), todavía hay un largo camino por recorrer para lograr un mayor conocimiento que permita garantizar la eficacia y la consistencia de la integración de muchos componentes a la vez dentro de una estrategia de manejo integrado de cultivos.



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.
- Abo-Amer, A. (2011). Biodegradation of diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 71-80.
- Adams, P., De-Leij, F. A. A. M., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54(2), 306-313.
- 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): e1002352. doi:10.1371/journal.pbio.1002352.
- Aino, M., Iwamoto, Y., Hashimoto, Y., & Ishikawa, K. (2007). Effect of the endophytic bacteria in lettuce (*Lactuca sativa*) roots suppressing infection of *Olpidium virulentus* viral vector for lettuce big-vein virus and possibility of the control of lettuce big-vein diseases by the endophytic bacteria. Kasai, Japón: Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries.
- Alabouvette, C., & Cordier, C. (2011). Risks of microbial biocontrol agents and regulation: are they in balance? En R. U. Ehlers (Eds.). *Regulation of biological control agents* (pp. 157-173). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Algam, S. A., Xie, G., Li, B., Yu, S., Su, T., & Larsen, J. (2010). Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia* wilt in tomato. *Journal of Plant Pathology*, 92(3), 593-600.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2926-2933.
- Andreoni, V., Colombo, M., Colombo, A., Vecchio, A., & Finoli, C. (2003). Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. *Annals of Microbiology*, 53(2), 135-148.
- Arshad, M., & Frankenberger Jr., W. T. (1993). Microbial production of plant growth regulators. En F. B. Metting Jr. (Ed.), *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management* (pp. 307-347). Nueva York, EE. UU.: Marcell Dekker Inc.
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-29. doi:10.1155/2011/460381.
- 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.
- Baider, A., & Cohen, Y. (2003). Synergistic interaction between BABA and mancozeb in controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. *Phytoparasitica*, 31(4), 399-409. doi:10.1007/BF02979812.
- Barber, M. S., Bertram, R. E., & Ride, J. P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(1), 3-12. doi:10.1016/0885-5765(89)90012-X.
- Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4089-4096. doi:10.1128/AEM.03043-10.
- Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 534-541.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their

- potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1044-1051.
- Benhamou, N., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1998). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204(2), 153-168. doi:10.1007/s004250050242.
- 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., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, 148. doi:10.3389/fmicb.2014.00148.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Koberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 995-1002. doi:10.1093/jxb/erv466.
- Bhattacharyya, P., & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. doi:10.1007/s11274-011-0979-9.
- Bosmans, L., De Bruijn, I., Gerards, S., Moerkens, R., Van Looveren, L., Wittemans, ... Lievens, B. (2017). Potential for biocontrol of hairy root disease by a *Paenibacillus* clade. *Frontiers in Microbiology* 8, 1-11. doi:10.3389/fmicb.2017.00447.
- 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.
- Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., Chen, W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73, 106-113. doi:10.1016/j.plaphy.2013.08.011.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 383(1-2), 3-41. doi:10.1007/s11104-014-2131-8.
- Campbell, R. (1991). *Biological control of microbial plant pathogens*. Nueva York, EE. UU.: Cambridge University Press.
- Castillo, D., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53-60.
- Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhoubib, A., & Sayadi, S. (2010). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 45(4), 507-513. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.009.
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block Quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17477-17500. doi:10.3390/ijms140917477.
- Chen, S.-K., Edwards, C. A., & Subler, S. (2001). Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology & Biochemistry*, 33(14), 1971-1980.
- Chen, T. H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment*, 34(1), 1-20. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x.
- Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., ... Hartmann, A. (2015). Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 984-995. doi:10.1094/MPMI-03-15-0066-R.
- Civerolo, E., & Keil, H. (1969). Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 59, 1966-1967.
- Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science*, 57(10), 946-950. doi:10.1002/ps.363.
- Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 448. doi:10.3389/fpls.2014.00448.
- Conrath, U., Domard, A., & Kauss, H. (1989). Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 8(3), 152-155. doi:10.1007/BF00716829.
- Cooksey, D. A. (1990). Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 28, 201-219. doi:10.1146/annurev.py.28.090190.001221.
- Cooksey, D. A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4), 381-386.
- Coons, G. H., & Kotila, J. E. (1925). The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. *Phytopathology*, 15, 357-370.

- Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W., & Kauss, H. (1985). Chitosan-Elicited Callose Synthesis in Soybean Cells as a Ca^{2+} -Dependent Process. *Plant Physiology*, 77(3), 544-551.
- Krishnamurthy, S. R., Janowski, A. B., Zhao, G., Barouch, D., & Wang, D. (2016). Hyperexpansion of RNA bacteriophage diversity. *Plos Biology*, 14(3): e1002409. doi:10.1371/journal.pbio.1002409.
- Kuchitsu, K., Kosaka, H., Shiga, T., & Shibuya, N. (1995). EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma*, 188(1-2), 138-142. doi:10.1007/BF01276805.
- Kusaba, M. (2004). RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2), 139-143. doi:10.1016/j.copbio.2004.02.004.
- Lee, Y. A., Henderson, M., Panopoulos, N. J., & Schroth, M. N. (1994). Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *Journal of Bacteriology*, 176(1), 173-188.
- Li, R.-X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.-R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *Plos One*, 10(6): e0130081. doi:10.1371/journal.pone.0130081.
- 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.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & der Lelie, D. v. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Science*, 21(6), 583-606. doi:10.1080/0735-260291044377.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- 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 (7409), 86-90. doi:10.1038/nature11237.
- Maiyappan, S., Amalraj, E., Santhosh, A., & Peter, A. (2010). Isolation, evaluation and formulation of selected microbial consortia for sustainable agriculture. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, 2(2), 109. doi:10.4172/2155-6202.1000109.
- Majumdar, R., Rajasekaran, K., & Cary, J. W. (2017). RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8, 200. doi:10.3389/fpls.2017.00200.
- Mallmann, W., & Hemstreet, C. (1924). Isolation of an inhibitory substance from plants. *Agricultural Research*, 28(6), 599-602. Recuperado de <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43966880/PDF>.
- Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., Hong, G.-J., Tao, X.-Y., Wang, L.-J., ... Chen, X.-Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1307-1313. doi:10.1038/nbt1352.
- Marques, M. P., Walshe, K., Doyle, S., Fernandes, P., & De Carvalho, C. C. (2012). Anchoring high-throughput screening methods to scale-up bioproduction of siderophores. *Process Biochemistry*, 47(3), 416-421. doi:10.1016/j.procbio.2011.11.020.
- Massart, S., Martinez-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.
- Matsubara, M., Lynch, J., & De Leij, F. (2006). A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1365-1372. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.04.025.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 443-465. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927.
- Meena, A. K., Verma, L., & Kumhar, B. L. (2017). RNAi, it's mechanism and potential use in crop improvement: A review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(2), 294-311. doi:10.18782/2320-7051.2890.
- Mendes, R. (2012). Microbioma da rizosfera e proteção de plantas. En Congresso Paulista de Fitopatologia 35º, *Summa Phytopathologica*, 38 (supplement). [CD-ROM]. Jaguariúna, Brasil.
- Menzies, J. D. (1959). Occurrence and transfer of abiological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathology*, 49, 648-652.
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206, 4393-4412. doi:10.1242/jeb.00709.
- Minami, E., Kuchitsu, K., He, D. Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y., & Shibuya, N. (1996). Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant and Cell Physiology*, 37(4), 563-567.

- 31-43. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285023312_Chitosan_and_trichoderma_harzianum_as_fungicide_alternatives_for_controlling_fusarium_crown_and_root_rot_of_tomato.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8(4), 968-987. doi:10.3390/md8040968.
- Ezra, D., Castillo, U. F., Strobel, G. A., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., ... Yaver, D. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*, 150(4), 785-793. doi:10.1099/mic.0.26645-0.
- Ezzi, M. I., & Lynch, J. M. (2005). Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 849-854. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.03.030.
- Faeth, S. H., & Fagan, W. F. (2002). Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, 42(2), 360-368. doi:10.1093/icb/42.2.360.
- Fakhro, A., Andrade-Linares, D. R., Von Bargen, S., Bandte, M., Büttner, C., Grosch, R., ... Franken, P. (2010). Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza*, 20(3), 191-200. doi:10.1007/s00572-009-0279-5.
- Felix, G., Baureithel, K., & Boller, T. (1998). Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiology*, 117(2), 643-650.
- Felix, G., Regenass, M., & Boller, T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal*, 4(2), 307-316. doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04020307.x.
- Ferri, M., Franceschetti, M., Naldrett, M. J., Saalbach, G., & Tassoni, A. (2014). Effects of chitosan on the protein profile of grape cell culture subcellular fractions. *Electrophoresis*, 35(11), 1685-1692. doi:10.1002/elps.201300624.
- Figueroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., ... Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springerplus*, 5, 330. doi:10.1186/s40064-016-1780-x.
- Figueroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Quiroz-Figueroa, F. R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2014). A high-throughput screening assay to identify bacterial antagonists against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(1), S125-133. doi:10.1002/jobm.201200594.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 (6669), 806-811.
- Fondong, V. N., Nagalakshmi, U., & Dinesh-Kumar, S. P. (2016). Novel functional genomics approaches: a promising future in the combat against plant viruses. *Phytopathology*, 106(10), 1231-1239. doi:10.1094/PHYTO-03-16-0145-FI.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1145-1152. doi:10.1007/s00253-007-1077-7.
- Frampton, R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*, 2012, 1-11. doi:10.1155/2012/326452.
- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337-359. doi:10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M., & Khavazi, K. (2013). Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, 37(3), 350-360. doi:10.3906/biy-1209-12.
- Gill, J., & Abedon, S. T. (2003). Bacteriophage ecology and plants. *APS Feature Stories*. doi:10.1094/APSnetFeature-2003-1103.
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, 30(10-11), 1389-1414. doi:10.1016/S0038-0717(97)00270-8.
- Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2008). Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, 7(4), 221-238. doi:10.1007/s11557-008-0571-3.
- Goy, R. C., Britto, D., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 19(3), 241-247. doi:10.1590/S0104-14282009000300013.
- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M., & Ramawat, K. G. (2012). Secondary metabolites and plant defence. En J. M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Plant Defence: Biological Control* (pp. 109-138). Dordrecht, Países Bajos: Springer.
- Gozzo, F., & Faoro, F. (2013). Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12473-12491. doi:10.1021/jf404156x.
- Grose, J. H., & Casjens, S. R. (2014). Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages

- Cooper, R. L., Laws, S. C., Das, P. C., Narotsky, M. G., Goldman, J. M., Lee Tyrey, E., & Stoker, T. E. (2007). Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 98-112.
- 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*, 28(3), 274-285. doi:10.1094/MPMI-10-14-0331-FI.
- Cotes, A. M., Lepoivre, P., & Semal, J. (1996). Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology*, 102(5), 497-506.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371-393. doi:10.1007/s10811-010-9560-4.
- D'Herelle, F. (1911). Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 152, 1413-1415.
- Dalton, D. A., Kramer, S., Azios, N., Fusaro, S., Cahill, E., Kennedy, C. (2004). Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), 469-479. doi:10.1016/j.femsec.2004.04.010.
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339-1345. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.032.
- De Jin, R., Suh, J. W., Park, R. D., Kim, Y. W., Krishnan, H., & Kim, K. Y. (2005). Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Nematology*, 7(1), 125-132.
- De Vasconcellos, R. L. F., & Cardoso, E. J. B. N. (2009). Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *BioControl*, 54(6), 807.
- Dick, R. P. (1992). A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 40(1-4), 25-36. doi:10.1016/0167-8809(92)90081-L.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 838-853. doi:10.1094/MPMI-19-0838.
- Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*, 145(3), 875-889. doi:10.1104/pp.107.103689.
- Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., & Zhang, L.-H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3526-3531. doi:10.1073/pnas.060023897.
- 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.
- Du Jardin, P. (2012). *The Science of Plant Biostimulants - A bibliographic analysis*. [Ad hoc study report to the European Commission DG Enterprise and Industry]. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2268/169257>.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Duan, C.-G., Wang, C.-H., & Guo, H.-S. (2012). Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*, 3(1), 5. doi:10.1186/1758-907X-3-5.
- Duffy, B. K., Simon, A., & Weller, D. (1996). Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86(2), 188-194. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n02_188.pdf.
- Dye, D. W. (1953). Control of *Pseudomonas syringae* with streptomycin. *Nature*, 172, 683-684. doi:10.1038/172683a0.
- El-Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (1991). Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15, 359-368. doi:10.1111/j.1745-4549.1991.tb00178.x.
- El-Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., & Arul, J. (1992). Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*, 27(9), 1016-1018.
- El-Mohamedy, R. S., Abdel-Kareem, F., Jaboun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2014). Chitosan and *Trichoderma harzianum* as fungicide alternatives for controlling *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 9,

- Jain, A., Singh, A., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. *Journal of Basic Microbiology*, 55(8), 961-972. doi:10.1002/jobm.201400628.
- Jain, R., Poulos, M. G., Gros, J., Chakravarty, A. K., & Shuman, S. (2011). Substrate specificity and mutational analysis of *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin, a eukaryal tRNA anticodon nuclease. *RNA*, 17(7), 1336-1343. doi:10.1261/rna.2722711.
- Jalilzadeh Yengejeh, R., Sekhavarjou, M., Maktabi, P., Arbab Soleimani, N., Khadivi, S., & Pourjafarian, V. (2014). The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. *International Journal of Environmental Research*, 8(2), 509-514. doi:10.22059/ijer.2014.744.
- Jetiyanon, K. (2007). Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus strains* (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biological Control*, 42(2), 178-185.
- Kaku, H., Shibuya, N., Xu, P., Aryan, A. P., & Fincher, G. B. (1997). N-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1→3)- β -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum*, 100, 111-118. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03460.x.
- Kannan, V., & Sureendar, R. (2009). Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. *Journal of Basic Microbiology*, 49, 158-164. doi:10.1002/jobm.200800011.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 1-9. doi:10.1007/s40502-015-0139-6.
- Katznelson, H. (1937). Bacteriophage in relation to plant diseases. *The Botanical Review*, 3, 499. doi:10.1007/BF02870486.
- Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science*, 47(1), 261-267. doi:10.2135/cropsci2006.03.0171.
- 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.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 533-544. doi:10.1007/s00253-013-5344-5.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., ... Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399. doi:10.1007/s00344-009-9103-x.
- Kikuyama, M., Kuchitsu, K., & Shibuya, N. (1997). Membrane depolarization induced by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*, 38(8), 902-909. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029250.
- Klopper, J. W., Rodríguez-Kábana, R., Zehnder, A. W., Murphy, J. F., Sikora, E., & Fernández, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28(1), 21-26. doi:10.1071/AP99003.
- Klopper, J., Reddy, M., Rodríguez-Kabana, R., Kenney, D., Kokalis-Burelle, N., & Martínez-Ochoa, N. (2004). Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticulturae*, 631, 219-229. doi:10.17660/ActaHortic.2004.631.28.
- Klopper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886. doi:10.1038/286885a0.
- Klopper, J. W., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2), 39-44. doi:10.1016/0167-7799(89)90057-7.
- Knip, M., Constantin, M. E., & Thordal-Christensen, H. (2014). Trans-kingdom cross-talk: Small RNAs on the move. *Plos Genetics*, 10(9): e1004602. doi:10.1371/journal.pgen.1004602.
- Koberl, 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.
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., ... Kogel, K.-H. (2016). An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *Plos Pathogens*, 12(10): e1005901. doi:10.1371/journal.ppat.1005901.

- that infect the bacterial family *Enterobacteriaceae*. *Virology*, 468, 421-443. doi:10.1016/j.virol.2014.08.024.
- Groszhans, H., & Filipowicz, W. (2008). Molecular biology: The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451(7177), 414-416. doi:10.1038/451414a.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., ... Chen, J. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumuloor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technology*, 101(22), 8599-8605. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.085.
- Guo, S., & Kempthues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4), 611-620.
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 117-153. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.
- Hadwiger, L. A. (2013). Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Science*, 208, 42-49. doi:10.1016/j.plantsci.2013.03.007.
- Haichar, F. E. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J. M., ... Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12), 1221-1230. doi:10.1038/ismej.2008.80.
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). Chapter two - The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (vol. 130, pp. 141-174). doi:10.1016/bs.agron.2014.10.001.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914. doi:10.1139/m97-131.
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, 37, 285-306. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.285.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. v. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463-471. doi:10.1016/j.tim.2008.07.008.
- Hariprasad, P., Navya, H., Chandra, S., & Niranjana, S. (2009). Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biological Control*, 50(3), 307-316. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.04.002.
- Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P., & Samiyappan, R. (2009). Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*. *Biological Control*, 51(1), 16-25. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.06.002.
- Hirst, J. M., Le Riche, H. H., & Bascomb, C. L. (1961). Copper accumulation in the soils of apple orchards near wisbech. *Plant Pathology*, 10(3), 105-108. doi:10.1111/j.1365-3059.1961.tb00127.x.
- Hoitink, H., & Boehm, M. (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 427-446. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.427.
- Hosseyini-Moghaddam, M. S., & Soltani, J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of Microbiology*, 64(2), 753-761. doi:10.1007/s13213-013-0710-1.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10. doi:10.1094/PDIS.2003.87.1.4.
- Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., & Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.3.248.
- Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., & Hussey, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14302-14306. doi:10.1073/pnas.0604698103.
- Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q., & Yang, X. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 741-755. doi:10.1007/s00253-011-3259-6.
- Hunter, R. D., Ekunwe, S. I., Dodor, D. E., Hwang, H.-M., & Ekunwe, L. (2005). *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(2), 267-271.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1704-1711. doi:10.1128/AEM.02118-06.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomasasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 493-500.
- Iwamoto, Y., Aino, M., Kanto, T., & Maekawa, K. (2003). Effective fungicides on *Olpidium brassicae* causing lettuce big-vein disease and optimum drenching conditions. *Japanese Journal of Phytopathology*, 69(4), 366-372.

- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Kumar, N. (2015). Biopesticides: Where We Stand? En N. K. Arora (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* (pp. 37-75). Nueva Delhi, India: Springer.
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., ... Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3(2), 1-10. doi:10.1038/nplants.2016.207.
- Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6(4), 245-252. doi:10.1007/s10123-003-0144-x.
- Moore, E. S. (1926). D'Herelle's bacteriophage in relation to plant parasites. *South African Journal of Science*, 23, 306.
- Moradi, H., Bahramnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A., & Haji-Allahverdipoor, K. (2012). Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *Plant Omics*, 5(2), 68-74.
- Moreno, C., Castillo, F., González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., ... Cotes, A. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(2), 111-120. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00939.x.
- Mulaw, T., Druzhinina, I., Kubicek, C., & Atanasova, L. (2013). Novel endophytic *Trichoderma* spp. isolated from healthy *Coffea arabica* roots are capable of controlling coffee tracheomycosis. *Diversity*, 5(4), 750-766. doi:10.3390/d5040750.
- Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Review*, 1(1), 69-79.
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2, 279-289. Recuperado de <http://www.plantcell.org/content/plantcell/2/4/279.full.pdf>.
- Neilands, J. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26723-26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., & Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14687-14692.
- Nielsen, P., & Sørensen, J. (1997). Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(3), 183-192. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00370.x.
- Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., & Minami, E. (1999). Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Molecular Biology*, 39(5), 907-914. doi:10.1023/A:1006161802334.
- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., ... Omori, T. (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiology*, 110, 387-392. doi:10.1104/pp.110.2.387.
- Nongmaithem, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2016). Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 305-313. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.008.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., ... Schweizer, P. (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22(9), 3130-3141. Recuperado de <http://www.plantcell.org/content/plantcell/22/9/3130.full.pdf>.
- Nunes, C. C., & Dean, R. A. (2012). Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology*, 13(5), 519-529. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00766.x.
- O'Sullivan, M., Stephens, P. M., & O'Gara, F. (1991). Extracellular protease production by fluorescent *Pseudomonas* spp. and the colonization of sugarbeet roots and soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 23(7), 623-627. doi:10.1016/0038-0717(91)90074-T.
- Ochoa, J. M., & Cotes, A. M. (1998). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum* mediante su actividad individual y combinada para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Fitopatología Colombiana*, 22, 88-93.
- Ofek, M., Hadar, Y., & Minz, D. (2012). Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). *Plos One*, 7(7): e40117. doi:10.1371/journal.pone.0040117.
- Okabe, N., & Goto, M. (1963). Bacteriophages of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1, 397-418. doi:10.1146/annurev.py.01.090163.002145.
- Omnilytics. (2018). *Changing the way the world treats bacterial disease*. Recuperado de <http://www.omnilytics.com/agriculture/>.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental*

- Microbiology*, 9(4), 1084-1090. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., & Birchler, J. A. (1997). Cosuppression in *Drosophila*: Gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-adh transgenes is polycomb dependent. *Cell*, 90(3), 479-490.
- Panwar, V., McCallum, B., Jordan, M., Loewen, M., Fobert, P., McCartney, C., Bakkeren, G. (2016). RNA silencing approaches for identifying pathogenicity and virulence elements towards engineering crop resistance to plant pathogenic fungi. *CAB Reviews*, 11(027), 1-13. doi:10.1079/PAVSNR201611027.
- Pietrzak, U., & McPhail, D. C. (2004). Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 122(2-4), 151-166. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.005.
- Pliego, C., Ramos, C., De Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil*, 340, 505-520. doi:10.1007/s11104-010-0615-8.
- Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., ... Perata, P. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Research*, 124(5), 619-629. doi:10.1007/s10265-010-0399-1.
- Prakash Verma, J., Yadav, J., Tiwari, K., & Jaiswal, D. (2013). Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 33-37. doi:10.1016/j.soilbio.2013.12.001.
- Qian, J., Li, D., Zhan, G., Zhang, L., Su, W., & Gao, P. (2012). Simultaneous biodegradation of Ni-citrate complexes and removal of nickel from solutions by *Pseudomonas alcaliphila*. *Bioresource Technology*, 116, 66-73. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.017.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037-1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465. doi:10.1021/bm034130m.
- Rajasekhar, L., Satish, K., Sain, & Divya, J. (2016). Evaluation of microbial consortium for plant health management of pigeonpea. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 6(2), 107-113. Recuperado de http://www.ijpaes.com/admin/php/uploads/958_pdf.pdf.
- Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158-1164. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.11.1158.
- Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S., & Kloepper, J. W. (1996). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against *Cucumber mosaic virus* using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease*, 80, 891-894. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Articles/PlantDisease80n08_891.PDF.
- Raymundo Raymundo, E., Nikolskii Gavrillo, I., Duwig, C., Prado Pano, B. L., Hidalgo Moreno, C. I., Gavi Reyes, F., & Figueroa Sandoval, B. (2009). Transporte de atrazina en un andosol y un vertisol de México. *Interciencia*, 34(5), 330-337. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911403005>.
- Ren, Y.-Y., & West, C.A. (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology*, 99, 1169-1178. doi: doi:10.1104/pp.99.3.1169.
- Renwick, A., Campbell, R., & Coe, S. (1991). Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40(4), 524-532. doi:10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x.
- Roberts, D. P., & Lohrke, S. M. (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research programs in biological control of plant diseases. *Pest Management Science*, 59(6-7), 654-664. doi:10.1002/ps.613.
- Roby, D., Gadelle, A., & Toppan, A. (1987). Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 143(3), 885-892. doi:10.1016/0006-291X(87)90332-9.
- Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6(22), 3343-3353. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x.
- Rose, M., Patti, A., Little, K., Brown, A. L., Jackson, W. R., & Cavagnaro, T. R. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (1.^a ed., vol. 124, pp. 37-89). EE. UU.: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-800138-7.0002-4.
- Rothstein, S. J., DiMaio, J., Strand, M., & Rice, D. (1987). Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8439-8443.

- Rudresh, D., Shivaprakash, M., & Prasad, R. (2005). Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Applied Soil Ecology*, 28(2), 139-146. doi:10.1016/j.apsoil.2004.07.005.
- Santos, A., Villamizar, L., García, M., Beltrán, C., & Cotes, A. M. (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Tecia solanivora* in potato seed-tuber treated with a powder formulation based on *Trichoderma koningiopsis* and baculovirus. *IOBC-WPRS Bulletin*, 115, 47-53.
- Senthilraja, G., Anand, T., Durairaj, C., Kennedy, J., Suresh, S., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leafminers and collar rot disease in groundnut. *Biocontrol Science and Technology*, 20(5), 449-464. doi:10.1080/09583150903576949.
- Serfling, A., Wirsal, S. G. R., Lind, V., & Deising, H. B. (2007). performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathology*, 97, 523-531. doi:10.1094/PHTO-97-4-0523.
- Shehata, H. R., Lyons, E. M., Jordan, K. S., & Raizada, M. N. (2016). Relevance of *in vitro* agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. *BMC Microbiology*, 16, 8. doi:10.1186/s12866-016-0623-9.
- Sheng, X., Chen, X., & He, L. (2008). Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(2), 88-95. doi:10.1016/j.ibiod.2007.12.003.
- Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21-43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- Sindhu, S., & Dadarwal, K. (2001). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 156(4), 353-358. doi:10.1078/0944-5013-00120.
- Singh, A., Sarma, B. K., Upadhyay, R. S., & Singh, H. B. (2013). Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research*, 168(1), 33-40. doi:10.1016/j.micres.2012.07.001.
- Singh, D., Chaudhary, S., Kumar, R., Sirohi, P., Mehla, K., Sirohi, A., ... Singh, P. K. (2016). RNA interference technology applications and limitations. En I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *RNA Interference*, InTech. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/rna-interference/rna-interference-technology-applications-and-limitations>. doi:10.5772/60631.
- Skopp, J., Jawson, M., & Doran, J. (1990). Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*, 54(6), 1619-1625. doi:10.2136/sssaj1990.03615995005400060018x.
- Srinivasan, K., & Mathivanan, N. (2011). Plant growth promoting microbial consortia mediated classical biocontrol of sunflower necrosis virus disease. *Journal of Biopesticides*, 4(1), 65-72. Recuperado de http://www.jbiopest.com/users/lw8/efiles/vol_4_1_241.pdf.
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., & Waller, F. (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), 1747-1751. doi:10.1093/pcp/pcn147.
- Stockwell, V., Johnson, K., Sugar, D., & Loper, J. (2011). Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology*, 101(1), 113-123. doi:10.1094/PHTO-03-10-0098.
- Summers, W. C. (2005). Bacteriophage research: early history. En E. Kutter & A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages: Biology and applications* (pp. 5-27). Boca Ratón, EE. UU.: CRC Press.
- Szittyá, G., & Burgyán, J. (2013). Rna interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. En B. R. Cullen (Ed.), *Intrinsic immunity* (pp. 153-181). Berlín, Alemania: Springer.
- Takai, R., Hasegawa, K., Kaku, H., Shibuya, N., & Minami, E. (2001). Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from *Arabidopsis*, in response to N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant Science*, 160(4), 577-583. doi:10.1016/S0168-9452(00)00390-3.
- Tang, J., Liu, Y., Li, H., Wang, L., Huang, K., & Chen, Z. (2015). Combining an antagonistic yeast with harpin treatment to control postharvest decay of kiwifruit. *Biological Control*, 89, 61-67. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.04.025.
- Tang, K., Zhang, Y., Yu, M., Shi, X., Coenye, T., Bossier, P., & Zhang, X.-H. (2013). Evaluation of a new high-throughput method for identifying quorum quenching bacteria. *Scientific Reports*, 3, 2935. doi:10.1038/srep02935.
- Tenllado, F., Llave, C., & Díaz-Ruiz, J. R. (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, 102(1), 85-96. doi:10.1016/j.virusres.2004.01.019.

- Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin—The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61-87. doi:10.1080/10408690390826455.
- Thayer, P. L., & Stall, R. E. (1961). A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1523, 163-165. Recuperado de [http://fshs.org/proceedings-o/1962-vol-75/163-165%20\(THAYER\).pdf](http://fshs.org/proceedings-o/1962-vol-75/163-165%20(THAYER).pdf).
- Thomas, R. (1935). A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. *Phytopathology*, 25, 371-372.
- Tian, H., Riggs, R. D., & Crippen, D. L. (2000). Control of soybean cyst nematode by chitinolytic bacteria with chitin substrate. *Journal of Nematology*, 32(4), 370-376. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620463/pdf/370.pdf>.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186, 1241-1243. doi:10.1016/S0140-6736(01)20383-3.
- Van Buren, A. M., Andre, C., & Ishimaru, C. (1993). Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, 83, 140-146.
- Van der Krol, A. R., Lenting, P. E., Veenstra, J., van der Meer, I. M., Koes, R. E., Gerats, A. G., ... Stuitje, A. R. (1988). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, 333, 866-869. doi:10.1038/333866a0.
- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*, 2(4), 291-299. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159886/pdf/020291.pdf>.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., ... Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159. doi:10.1016/j.funeco.2009.05.001.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143-148. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01939.x.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., ... Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 80-86. doi:10.1016/j.pmp.2008.05.005.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828-840. doi:10.1038/nrmicro2910.
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K. R., & Formanek, P. (2011). Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil*, 342(1), 31-48. doi:10.1007/s11104-010-0673-y.
- Walker-Simmons, M., & Ryan, C. A. (1984). Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves: Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. *Plant Physiology*, 76(3), 787-790. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1064374/pdf/plntphys00581-0243.pdf>.
- Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., ... Prithiviraj, B. (2013a).

- Erratum to: regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 340-341. doi:10.1007/s00344-012-9311-7.
- Wally, O. S. D., Critchley, A.T., Hiltz, D., Craigie, J.S., Han, X., Zaharia, L. I., ... Prithiviraj, B. (2013b). Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 324-339. doi:10.1007/s00344-012-9301-9.
- Wang, M., & Jin, H. (2017). Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in Microbiology*, 25(1), 4-6. doi:10.1016/j.tim.2016.11.011.
- Wang, M., Thomas, N., & Jin, H. (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre-and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 133-141. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.-M., Thomma, B. P., Huang, H.-D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2, 1-10. doi:10.1038/nplants.2016.151.
- 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.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73(2), 274-276. doi:10.2307/3545919.
- Winterowd, J., & Sandford, P. (1995). Chitin and chitosan. En A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 441-462) Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.
- Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., & Akatsuka, T. (1993). Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-Acetyl-chitooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(1), 405-409. doi:10.1271/bbb.57.405.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(4), 1-4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004.
- Yin, H., Zhao, X., & Du, Y. (2010). Oligochitosan: A plant diseases vaccine—A review. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 1-8. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.066.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47, 138-145. doi:10.1016/j.ejsobi.2010.11.001.
- Zhang, J., Bruton, B., Howell, C., & Miller, M. (1999). Potential of *Trichoderma virens* for biocontrol of root rot and vine decline in *Cucumis melo* L. caused by *Monoporascus cannonballus*. *Subtropical Plant Science*, 51, 29-37.
- Zhu, Z., Zhang, B., Chen, B., Cai, Q., & Lin, W. (2016). Biosurfactant production by marine-originated bacteria *Bacillus subtilis* and its application for crude oil removal. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(9), 328. doi:10.1007/s11270-016-3012-y.