



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**MODULACIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS Y  
FÚNGICAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE *Vitis vinifera*  
MEDIANTE EL USO DE BIOESTIMULANTE**

---

Por:

**Dailen Azaharez Llorente**

Tesis aprobada por la

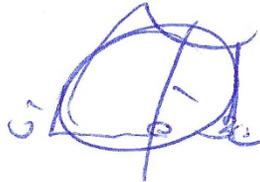
Coordinación de Ciencia de los Alimentos

Como requisito parcial para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para la revisión de la tesis de Dailen Azaharez Llorente, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



---

Dr. Ali Asaff Torres  
Director de Tesis



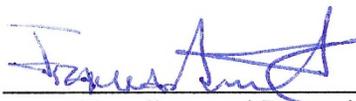
---

Dr. Jorge Verdín  
Co-director de Tesis



---

Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate  
Integrante de comité de tesis



---

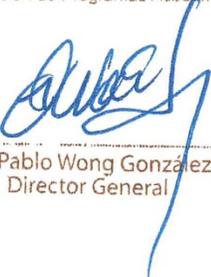
Dra. Itzamná Baqueiro Peña  
Integrante de comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Modulación de las Poblaciones Bacterianas y Fúngicas Asociadas a la Rizosfera de *Vitis vinifera* Mediante el uso de Bioestimulantes” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Dailen Azaharez Llorente, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por la beca de maestría (No.636727).

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD A.C por permitirme ser parte de la comunidad científica.

A INNOVAK GLOBAL por el financiamiento del proyecto (20475).

A mi director de tesis Dr. Ali Asaff Torres por aceptarme en su grupo de trabajo, su asesoramiento y enseñanza en mi formación científica.

A mi comité de tesis. Mi co-director Dr. Jorge Verdín por su confianza y guiarme en la ejecución de gran parte de este trabajo. A mis asesores Dr. Miguel Ángel y Dra. Itzamná Baqueiro Peña, por el apoyo y sus recomendaciones para el desarrollo de mi tesis.

A todos los estudiantes, técnicos e investigadores del Laboratorio de Biotecnología Industrial de la coordinación de Ciencias de los Alimentos de CIAD.

A todos los estudiantes, técnicos e investigadores del laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco, CIATEJ

Al Grupo Agrícola Alta por permitirnos hacer las pruebas de campo

A Amanda por apoyo en todo el trabajo realizado en el laboratorio

A mis compañeros de maestría y amigos en CIAD

A mi familia

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	12
2.1. Rizosfera.....	12
2.2. Microbioma de la Rizosfera.....	13
2.3. Comunidades Microbianas del Suelo.....	14
2.3.1. Hongos Micorrízicos Arbusculares .....	15
2.3.2. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal.....	16
2.4. Actividad Microbiana en el Suelo.....	17
2.5. Factores que Determinan la Composición de la Microbiota de la Rizosfera.....	19
2.6. Exudados Radiculares.....	20
2.7. Influencia de Factores Edáficos y Climatológicos.....	22
2.8. Análisis de la Composición de la Microbiota de la Rizosfera.....	22
2.8.1. Técnicas Tradicionales para el Estudio de Comunidades Microbianas.....	23
2.8.2. Técnicas Moleculares Independientes de Cultivo .....	24
2.9. La Microbiota Rizosférica en Vid.....	25
2.10. Tipos de Manejo de Cultivo (Estrategias para Aumentar la Producción del Cultivo).....	27
2.11. Bioestimulantes.....	28
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Específicos.....	33
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
5.1. Área de Estudio y Toma de Muestras.....	34
5.2. Extracción de Muestras de Rizosfera y Rizoplano.....	35
5.3. Actividad Microbiana en Suelo no Rizosférico y Rizosférico.....	36
5.3.1. Hidrólisis de di-acetato de Fluoresceína .....	36
5.3.2. Actividad Deshidrogenasa .....	37
5.4. Conteo de Microorganismos Cultivables en el Suelo.....	37
5.5. Conteo de Nemátodos.....	38
5.6. Extracción y Secuenciación de ADN Metagenómico.....	38
5.6. Cuantificación Absoluta de Bacterias y Hongos Mediante PCR en Tiempo Real (qPCR).....	39

## CONTENIDO (continuación)

5.7. Análisis Estadístico.....	40
5.8. Análisis Bioinformático.....	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
6.1. Caracterización y Cuantificación de las Poblaciones Microbianas.....	42
6.1.1. Cuantificación Indirecta Mediante Actividades Enzimáticas .....	42
6.1.1.1 Hidrólisis de DAF en suelo no rizosférico y rizosférico. ....	42
6.1.1.2. Actividad deshidrogenasa (DH) en suelo no rizosférico y rizosférico.....	44
6.2. Cuantificación de Principales Grupos de Microorganismos y Nemátodos Mediante Técnicas Convencionales.....	47
6.3. Cuantificación Absoluta de Poblaciones Bacterianas y Fúngicas Asociadas al Cultivo de la Vid.....	54
6.4. Análisis del Microbioma Presente en el Suelo no Rizosférico y Rizosférico Asociado a las Vides.....	63
6.4.1. Diversidad Dentro (diversidad $\alpha$ ) y entre las Muestras de Suelo, Rizosfera y Rizoplano (Diversidad $\beta$ ).....	65
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1	Representación de la rizosfera, rizoplano y endosfera ..... 12
2	Localización geográfica del viñedo en estudio..... 34
3	Actividad enzimática en suelo no rizosférico y rizosférico ..... 44
4	Conteo de UFC/g de suelo de a) Mesófilos aerobios y (b) hongos y levaduras en el suelo no rizosférico ..... 48
5	Conteo de UFC/g de suelo de (a) fijadores de N y b) solubilizadores de P en el suelo no rizosférico ..... 49
6	Conteo de (a) <i>Pseudomonas</i> sp (UFC/g de suelo y b) <i>Meloidogyne</i> sp (Individuos/100cc en el suelo no rizosférico..... 50
7	Cantidad absoluta de bacterias en suelo no rizosférico, suelo rizosférico y rizoplano..... 57
8	Cantidad absoluta de hongos en suelo no rizosférico, suelo rizosférico y rizoplano..... 57
9	Proporción que ocupa cada grupo microbiano (hongos y bacterias) en suelo no rizosférico, suelo rizosférico y rizoplano..... 58
10	Correlación entre bacterias y hongos totales y actividad enzimática en el suelo no rizosférico y suelo rizosférico en poscosecha..... 59
11	Correlación entre poblaciones de <i>Meloidogyne</i> sp presentes en el suelo rizosférico y actividad enzimática durante la poscosecha..... 60
12	Correlación entre el total de hongos y bacterias (en el suelo no rizosférico y rizosférico) y cantidad de nematodos en el suelo no rizosférico durante la poscosecha..... 61
13	Abundancia relativa de las clases más representativas en suelo (S), rizósfera (R) y rizoplano (Rp) durante la brotación y poscosecha del cultivo ..... 65
14	Diversidad $\alpha$ (dentro de la muestra) entre los compartimientos suelo (S), rizosfera (R) y rizoplano (Rp) en brotación y poscosecha..... 67
15	Análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de la matriz de Bray Curtis para el análisis de la diversidad $\beta$ (entre las muestras)..... 69

## RESUMEN

La rizosfera es un ambiente complejo donde interactúan diversas poblaciones microbianas con las raíces de las plantas. Comprender la estructura y diversidad de microorganismos que habitan en este compartimento, permite aprovechar las interacciones planta-microorganismo para aumentar la productividad de suelos agrícolas y la sanidad de los cultivos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un par de bioestimulantes (ExuRoot® + Nutrisorb®, Innovak Global, México) sobre el microbioma rizosférico de *Vitis vinifera* var. Flame, como modelo de cultivo perenne. Se recolectaron muestras (n=3) compuestas por las raíces de siete plantas durante las etapas de brotación y poscosecha del cultivo. El microbioma rizosférico se caracterizó mediante tres enfoques: la cuantificación de la actividad enzimática (hidrólisis de diacetato de fluoresceína y deshidrogenasa) por espectrofotometría. Por los métodos tradicionales de conteo en placas y tamizado-centrifugación, se determinó el total de UFC de grupos microbianos funcionales y nematodos en el suelo; así como el total de bacterias y hongos por qPCR. La abundancia y diversidad bacteriana se evaluó mediante la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S utilizando la plataforma Illumina MiSeq. Se encontraron cambios significativos en la concentración de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)-formazán y fluoresceína en el suelo no rizosférico tratado con un aumento del 52% ( $p < 0.05$ ) en ambos casos. En la rizosfera, los cambios en la actividad enzimática fueron más notables según la etapa fenológica del cultivo, con un aumento de 700% y 93% de las concentraciones de TTC-formazán y fluoresceína, respectivamente. Hacia la poscosecha aumentó el número de UFC/g de suelo de mesófilos aerobios, fijadores de N, *Pseudomonas*, así como la disminución de nemátodos; siendo significativo el aumento de solubilizadores de P por la aplicación del tratamiento. Para el análisis metataxonómico, se obtuvo un total de 1,696,278 lecturas de alta calidad que se agruparon en 26,332 OTUs bacterianas, usando como criterio de agrupamiento un 97% de identidad de las secuencias. Las clases bacterianas más abundantes en el suelo no rizosférico fueron *Actinobacteria* y *Bacilli*, ésta última con una reducción significativa hacia la poscosecha. *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetacea* y *Bacteroidia* fueron más abundantes en el suelo rizosférico control y tratado con bioestimulantes. La menor diversidad  $\alpha$  se observó en el suelo no rizosférico durante la brotación. El análisis de

coordinadas principales mostró separaciones claras entre la microbiota del suelo no rizosférico y rizosférico en las dos etapas fenológicas estudiadas.

**Palabras claves:** microorganismos, suelo rizosférico, bioestimulantes, biodiversidad, actividad enzimática.

## ABSTRACT

The rhizosphere is a complex environment where diverse microbial populations interact with plant roots. Understanding the structure and diversity of microorganisms that inhabit this compartment allows us to take advantage of plant-microorganism interactions to increase the productivity of agricultural soils and the health of crops. The objective of this study was to evaluate the effect of a pair of biostimulants (ExuRoot® + Nutrisorb®, Innovak Global, Mexico) on the rhizospheric microbiome of *Vitis vinifera* var. Flame, as a perennial crop model. Samples (n = 3) composed of the roots of seven plants were collected during the sprouting and postharvest stages of the crop. The rhizospheric microbiome was characterized by three approaches: the quantification of enzymatic activity (fluorescein diacetate hydrolysis and dehydrogenase) by spectrophotometry. By the traditional methods of plate counting and sieving-centrifugation, the total CFU of functional microbial groups and nematodes in the soil was determined; as well as total bacteria and fungi by qPCR. As well as bacterial abundance and diversity evaluated by sequencing the 16S ribosomal RNA gene using the Illumina MiSeq platform. Significant changes were found in the concentration of triphenyltetrazolium chloride (TTC) -formazan and fluorescein in the non-rhizospheric soil treated with a 52% increase ( $p < 0.05$ ) in both cases. In the rhizosphere the changes in the enzymatic activity were more notable according to the phenological stage of the culture, with an increase of 700% and 93% of the concentrations of TTC-formazan and fluorescein, respectively. Towards the post-harvest, the number of CFU/ g of soil of aerobic mesophiles, fixatives of N, *Pseudomonas*, as well as the decrease of nematodes; the increase in P solubilizers being significant due to the application of the treatment. For the metataxonomic analysis, a total of 1,696,278 high quality readings were obtained, which were grouped into 26,332 bacterial OTUs, using 97% sequence identity as a grouping criterion. The most abundant bacterial classes in the non-rhizospheric soil were *Actinobacteria* and *Bacilli*, the latter with a significant reduction towards postharvest. *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetacea* and *Bacteroidia* were more abundant in the control rhizospheric soil and treated with biostimulants. The lowest  $\alpha$  diversity was observed in the non-rhizospheric soil during sprouting. The main coordinate analysis showed clear separations between the microbiota of the non-rhizospheric and rhizospheric soil in the two phenological stages studied.

**Keywords:** microorganisms, rhizospheric soil, biostimulants, biodiversity, enzymatic activity

## 1. INTRODUCCIÓN

La uva de mesa (*Vitis vinifera*) es un fruto de exportación de alto valor que representa una fuente económica importante y generadora de empleo por el uso extensivo de la mano de obra que requiere su cultivo (Vázquez, 2011b; Torres *et al.*, 2014), siendo el Estado de Sonora el mayor productor (93%) (SIAP-SAGARPA, 2017). La alta demanda, nacional e internacional, de este fruto obliga a los productores a definir acciones que permitan el desarrollo de la viticultura de manera sostenida y competitiva (Montaño y Preciado, 2017).

La productividad de estos sistemas agrícolas depende grandemente de los procesos que ocurren en la rizosfera (Vega-Ávila *et al.*, 2015), zona donde habitan microorganismos responsables de los ciclos biogeoquímicos y donde ocurre la descomposición de materia orgánica, la estructuración del suelo, entre otras funciones (Philippot *et al.*, 2013). Además, pueden afectar el crecimiento y la salud de las plantas a través de la colonización de las raíces por hongos micorrízicos, bacterias rizosféricas que promueven el crecimiento vegetal, o de manera negativa por la presencia de patógenos en el suelo (Dessaux *et al.*, 2016; Hendgen *et al.*, 2018).

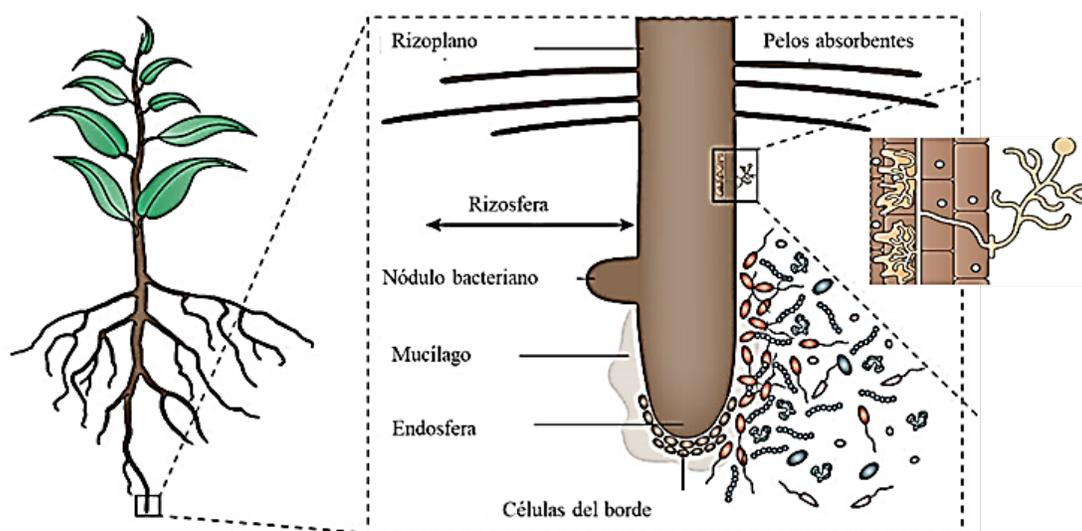
La agricultura actual busca estrategias para aumentar la productividad agrícola con el empleo de bioestimulantes que mejoren la fisiología y la productividad de las plantas, pudiendo también modificar la estructura y diversidad microbiana asociada a las raíces (Pinto y Gomes, 2016).

Se conoce poco sobre la influencia de factores bióticos y abióticos (manejo del cultivo, características fisicoquímicas del suelo y fisiología de la planta) en la distribución de las comunidades microbianas asociadas al cultivo de vid, de alta importancia económica en la región. Además, no existen datos suficientes que permitan establecer correlaciones entre la composición y la actividad de microorganismos del suelo con el estado nutricional y rendimiento del cultivo, tanto a nivel de cantidad, como de calidad de los frutos e incidencia de enfermedades. Para ello, es necesario comprender y controlar la estructura y función de la rizosfera, así como aprovechar las interacciones entre plantas y microorganismos para mejorar la calidad de los suelos agrícolas y la productividad del ecosistema vegetal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Rizosfera

En la zona estrecha de contacto entre las partículas del suelo y las raíces de las plantas se encuentra la rizosfera, ambiente altamente dinámico que se relaciona de manera intrínseca con la fertilidad de los suelos agrícolas y la salud de las plantas (Philippot *et al.*, 2013; Dessaux *et al.*, 2016). Algunos autores delimitan a esta región como aproximadamente los primeros 3 mm de suelo a partir de las raíces; sin embargo, se sugiere no definir la zona a partir de tamaños y formas, sino como un gradiente de propiedades químicas, físicas y biológicas a lo largo de la raíz (Ahkami *et al.*, 2017). Se considera el primer hábitat ecológico donde los agentes biológicos están asociados a las raíces vegetales y existe un flujo constante de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis. Esto permite que en esta zona del suelo ocurra la mayor actividad microbiana influenciada de forma directa por factores abióticos, como la composición mineral y las propiedades físicas y químicas del suelo (Berg y Smalla, 2009; Rugova *et al.*, 2017; Sarabia *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Representación de la rizosfera (capa de suelo de 1-3mm que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas), rizoplasma y endosfera (Adaptada de Edwards *et al.*, 2015).

La rizosfera incluye tres zonas: la endorrizosfera que abarca porciones del córtex de la raíz y la endodermis, donde residen microorganismos e iones minerales en el espacio apoplástico entre las células; una zona intermedia entre las células epidérmicas de la raíz y el mucílago llamada rizoplano; además de la ectorizosfera o rizosfera que abarca la zona más externa y se extiende desde el rizoplano hasta el seno del suelo (Fig.1).

El suelo unido a las raíces vegetales puede contener hasta  $10^{10}$  células por gramo de raíz y más de 30,000 especies procariotas. El conjunto de genomas de estas comunidades microbianas es mayor que el de la planta y se le conoce también como el segundo genoma de la planta o microbioma (Berendsen *et al.*, 2012; McNear, 2013; Ahkami *et al.*, 2017).

## 2.2. Microbioma de la Rizosfera

Las plantas albergan en sus distintos órganos una comunidad microbiana identificable y funcionalmente diferente, que se relaciona con el medio físicoquímico y con la disponibilidad y competencia por nutrientes con otros microorganismos (Pinto *et al.*, 2016). El microbioma, como se ha mencionado anteriormente, se considera el segundo genoma de las plantas. Varios autores lo describen como el conjunto de genomas de las comunidades microbianas que pueden vivir, prosperar e interactuar con diferentes tejidos, brotes, frutos, hojas, raíces, entre otros (Mueller y Sachs, 2015; Nelson, 2017; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018).

En el caso particular del microbioma de la raíz, está formado por numerosos organismos neutrales, benéficos o patógenos, que colonizan estas estructuras. Estudios sobre el microbioma central de la raíz de *Arabidopsis* sp., basados en la secuenciación de alto rendimiento, han demostrado que los filos dominantes dentro de la raíz son mucho menos diversos que los filos presentes en el suelo circundante. Se estima que hay una pérdida dramática de diversidad a medida que el nivel espacial de "intimidad" en la relación planta-microorganismo aumenta. Además, el microbioma endófito puede presentar variaciones que dependen de la especie de la planta y una mayor variación cuando se examinan especies relacionadas (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012).

El microbioma de la raíz ha sido objeto de estudio en varios cultivos de importancia económica. En arroz, Edwards *et al.* (2015) observaron diferentes patrones de abundancia entre los filos de los

compartimientos de la rizosfera: una abundancia de *Acidobacterias* en la rizosfera mayor que en la endosfera, así como una proporción menor de *Proteobacteria* y *Cloroflexi* en la rizosfera que en la endosfera. Sus resultados les permitieron establecer un modelo a través del cual se puede ensamblar el microbioma en las raíces que involucra dos pasos: el primero consiste en un reclutamiento general de los microorganismos presentes en la vecindad de las raíces; mientras que el segundo supone la entrada de microorganismos específicos dentro de la raíz, lo que involucra factores genéticos propios de la especie. Este modelo de adquisición del microbioma está dirigido, además, por factores bióticos y abióticos, y se considera similar para otras especies de plantas terrestres. La microbiota del suelo asociada a plantas está compuesta por diversos organismos patógenos, neutrales, o beneficiosos, cuya complejidad estructural y funcional puede desempeñar un papel beneficioso al mejorar el crecimiento, la salud y la producción de los cultivos, así como la resistencia al estrés biótico y abiótico. (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015; Berg *et al.*, 2016). Debido a la fuerte influencia que tiene el microbioma rizosférico en la salud de las plantas, es necesario conocer y predecir, en la medida de lo posible, el comportamiento de la microbiota rizosférica y aprovechar las interacciones planta-microorganismo como un medio para aumentar o restaurar la calidad de suelos agrícolas, la productividad del ecosistema vegetal, así como la respuesta de la planta ante perturbaciones bióticas y abióticas (Ahkami *et al.*, 2017; Rugova *et al.*, 2017).

### 2.3. Comunidades Microbianas del Suelo

Las poblaciones microbianas del suelo pueden cambiar su estructura y composición en diferentes gradientes espaciales y ecológicos, además de modular de forma directa o indirecta la salud de las plantas (Hanson *et al.*, 2012; Nemergut *et al.*, 2013). Gran parte de estos organismos actúan de forma benéfica sobre las plantas; sin embargo, algunos fitopatógenos también pueden influir negativamente (Sugiyama *et al.*, 2014; Panke-Buisse *et al.*, 2015). Las interacciones microorganismo-microorganismo y planta-microorganismo se dan, en su mayoría, en la interfaz raíz-suelo. La mayoría de los estudios microbiológicos de la rizosfera, especialmente aquellos que describen interacciones microbianas cooperativas, han centrado su atención en bacterias y hongos. Estos se clasifican, según sus funciones, en hongos micorrízicos arbusculares y bacterias

promotoras del crecimiento (Pedraza *et al.*, 2010; Rolli *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018a).

### 2.3.1. Hongos Micorrízicos Arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) forman asociaciones simbióticas con aproximadamente el 80% de las plantas terrestres y juegan un papel significativo en la descomposición de la materia orgánica (Averill *et al.*, 2014); poseen hifas que proliferan extensivamente sobre materiales orgánicos ricos en nutrientes y transfieren a las plantas cantidades sustanciales de fósforo y nitrógeno (Xu *et al.*, 2018 a). Los exudados de las hifas contienen iones  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $HCO_3^{2-}$ , azúcares de bajo peso molecular (glicoproteínas) y ácidos orgánicos que están involucrados en los cambios de pH en el suelo y el flujo de carbono (C), e influyen incluso en las actividades y la composición de las comunidades bacterianas asociadas (Serralde y Ramírez, 2004; Xu *et al.*, 2018 a).

Los HMA forman en las raíces de las plantas una estructura que se desarrolla como una extensión, mejorando la nutrición mineral y absorción de agua, especialmente cuando estos recursos son escasos en el suelo, además de protegerlas del ataque de fitopatógenos (Cuenca, 2015; Bertolini *et al.*, 2018). La simbiosis tiene lugar cuando inicia el contacto entre la hifa fúngica y la célula epidérmica vegetal para la formación del apresorio, estructura adhesiva y achatada a partir del cual se origina una hifa que penetra la cutícula de las células epidérmicas del hospedero, esto permite la penetración del micelio y el crecimiento de las micorrizas arbusculares en el interior de las células vegetales. La penetración al tejido vegetal se produce por la combinación de estrategias mecánicas y enzimáticas, además de la participación coordinada de la maquinaria del hospedero y del hongo, donde se destacan las enzimas fúngicas (exo- y endoglucanasas, celulasas, xiloglucanasas y enzimas pectinolíticas) que degradan la pared celular vegetal. Estos representantes fúngicos mejoran el crecimiento de especies vegetales como *V. vinifera*, tanto en condiciones normales, como de estrés. La amplia diversidad de HMA que colonizan las raíces de *V. vinifera* se ha estudiado por autores como Trouvelot *et al.*, (2015) y Novello *et al.*, (2017), quienes reportaron más de 40 taxones diferentes asociados a las vides, atribuidas principalmente a los géneros *Funneliformis* y *Rhizophagus*.

### 2.3.2. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) son un grupo importante de la microbiota edáfica que ocupa el mayor porcentaje del total de microorganismos. Tienen capacidades simbióticas y entre estos *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., son los representantes más conocidos, capaces de colonizar la rizosfera o tejidos de raíces de los cultivos (Sarma *et al.*, 2015, Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

Los exudados radiculares (ácidos orgánicos, aminoácidos, compuestos fenólicos, azúcares y proteínas) constituyen la primera línea de comunicación entre las raíces y las PGPR. Las bacterias, atraídas por quimiotaxis por los exudados, se desplazan hacia las raíces gracias a la presencia de flagelos, de esta forma, permiten que inicie el proceso de nodulación y organogénesis, siendo estos compuestos orgánicos los que sostienen la actividad metabólica de la biomasa microbiana haciéndola más activa, abundante y diversa, en comparación con aquellos microorganismos que se encuentran en el suelo desnudo (Mendes *et al.*, 2013).

Las diversas funciones de las PGPR han sido bien descritas, especialmente en estudios *in vitro*, actúan de manera directa aumentando la disponibilidad de compuestos orgánicos en el suelo promoviendo el crecimiento de las raíces y los pelos absorbentes, lo que permite mayor toma de nutrientes y desarrollo de las plantas. De manera indirecta contribuyen a la síntesis de hormonas vegetales (auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, citocininas y otras) y a la resistencia frente a fitopatógenos (Philippot *et al.*, 2013; Panke-Buisse *et al.*, 2015). Se destaca la capacidad que tienen de mejorar la absorción de nutrientes, la fijación biológica de N, la solubilización de P, así como la producción de sideróforos para la solubilización de formas no asimilables de hierro, para que estén disponibles para la planta y otros organismos terrestres. Además, tienen la capacidad de aumentar el contenido mineral de los cultivos y su actividad fotosintética. Todo esto ocurre al colonizar el tejido radicular, con impacto positivo en la morfogénesis y el incremento de las raíces y los pelos radicales (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Cedeño *et al.*, 2017).

La aplicación de PGPR en suelos agrícolas, ha incrementado la productividad del 5 al 30%, en diferentes cultivos de maíz y soya. La colonización por *Pseudomonas fluorescens* de raíces de *Arabidopsis thaliana* ha mostrado una mayor protección sistémica hacia diferentes tipos de patógenos como *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* y al hongo de raíz *Fusarium oxysporum*

(Cedeño *et al.*, 2017). Para probar su efecto en el desarrollo vegetal, también se han evaluado cepas aisladas de diferentes orígenes (vid, olivo y pimiento) en distintas variedades de *V. vinifera*. Los resultados son beneficiosos al incrementar el diámetro y la longitud de los brotes, así como el número de racimos en plantas. Este grupo bacteriano puede utilizarse como un recurso biotecnológico útil en diferentes especies vegetales (Rolli *et al.*, 2017).

La presencia de estos microorganismos en el suelo ya sea de manera natural o inoculados a partir de enmiendas orgánicas, puede reducir las enfermedades transmitidas por fitopatógenos, fenómeno que se conoce como supresión de enfermedades y está dada por la actividad microbiana total. En los suelos supresores de enfermedades se ha observado una acumulación de bacterias como *Pseudomonas* sp., capaces de producir compuestos antifúngicos, además de otros grupos bacterianos que pueden conferir supresión como los pertenecientes a los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes*. Los mecanismos de supresión de patógenos pueden ser variados e incluyen la producción de compuestos antibióticos, la competencia por (micro y macro) nutrientes y la producción de enzimas líticas (Berendsen *et al.*, 2012; Doornbos *et al.*, 2012).

#### 2.4. Actividad Microbiana en el Suelo

El suelo es el hábitat ecológico que alberga más especies microbianas y donde ocurre la mayor actividad metabólica. El ciclo biogeoquímico de varios elementos en el suelo, la degradación de contaminantes (metales pesados), el mantenimiento de la estructura edáfica, la descomposición de materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes y el control biológico son algunas de las actividades llevadas a cabo por el componente microbiológico del suelo. De ahí que estos agentes biológicos se han propuesto como indicadores válidos para evaluar el impacto generado por las actividades agropecuarias (Romaniuk *et al.*, 2011). La mayoría de las funciones de los microorganismos son críticas en la productividad de los cultivos, en la sustentabilidad del suelo y la calidad ambiental. La calidad del suelo es reconocida como la capacidad de este recurso dentro de ecosistemas naturales o antrópicos, para sostener o mejorar la productividad animal y vegetal, así como controlar la calidad ambiental y soportar la habitabilidad y salud del hombre (Vallejo-Quintero, 2013). Para conocer su estabilidad, se requiere del monitoreo de parámetros de naturaleza

fisicoquímica (estabilidad de agregados, pH, conductividad eléctrica), química (parámetros nutricionales y fracciones de carbono) y biológica del suelo, donde juegan un rol importante los microorganismos y su actividad metabólica (Ramírez y Trujillo, 2012). La elevada sensibilidad de los microorganismos a disturbios antropogénicos y su capacidad de responder en menor tiempo en comparación con factores físicos o químicos, son algunas características que los convierte en indicadores ideales de la calidad del suelo (De la Paz-Jiménez *et al.*, 2002; Vallejo-Quintero, 2013). La respiración del suelo, biomasa microbiana, tasa de crecimiento, tiempo de generación, conteo de especies y grupos de la fauna del suelo (biodiversidad del suelo), así como los ensayos para medir actividad enzimática, son parámetros que indican el balance de la actividad metabólica de los microorganismos edáficos (García y Ramírez, 2012; Hanson *et al.*, 2012; Morrison-Whittle *et al.*, 2017). En un suelo con condiciones fisicoquímicas óptimas se desarrolla una buena actividad microbiana y se llevan a cabo adecuadamente los procesos metabólicos de bacterias, hongos, algas y actinomicetos que actúan sobre sustratos orgánicos y cultivos asociados (Ramos y Zúñiga, 2008). Más del 90% del flujo de energía en el suelo pasa a través de descomponedores microbianos, por tanto, un ensayo que mide la actividad de descomposición de un elemento en particular por un microorganismo puede estimar la actividad microbiana total (Adam y Duncan, 2001). En ese sentido, se han empleado técnicas sencillas con reactivos químicos para la medición de la actividad microbiana en el laboratorio. Uno de ellos es utilizado para medir la actividad microbiana en un amplio rango de muestras de suelo, a través del monitoreo de la concentración de di-acetato de fluoresceína (DAF); los hongos y bacterias tienen la capacidad de secretar enzimas como lipasas, proteasas y esterases, o bien, poseen enzimas que se encuentran unidas a las membranas celulares, estas enzimas llevan a cabo el proceso de hidrólisis del diacetato de fluoresceína a través de una reacción de hidrólisis seguida de una reacción de deshidratación que resulta en la liberación de fluoresceína (compuesto coloreado) y una pérdida general de agua. Este producto final absorbe fuertemente a una longitud de onda de 490 nm por lo que se puede medir su concentración por espectrofotometría (Adam y Duncan, 2001; Ramírez y Trujillo, 2012). Por otro lado, la oxidación biológica de compuestos orgánicos a partir de los procesos de deshidrogenación se lleva a cabo por enzimas presentes en el suelo. Las deshidrogenasas forman parte integral de los microorganismos, razón por la cual se utilizan como indicadores biológicos para medir la actividad microbiana, para comparar suelos naturales y de cultivo, así como evaluar los efectos de diferentes sistemas de manejo agrícola y suelos contaminados por metales pesados, plaguicidas entre otros. Otra de las

técnicas para monitorear la actividad microbiana es utilizando la sal hidrosoluble de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC, por sus siglas en inglés) que, en ausencia de oxígeno, actúa cuantitativamente como aceptor terminal de  $H^+$  con la formación final de formazán; producto que puede medirse por espectrofotometría a una longitud de onda de 485nm. Las deshidrogenasas, al ser enzimas intracelulares, están presentes en células intactas y representan la actividad metabólica de los microorganismos vivos en el suelo en el momento en que se realiza su estudio (Kumar *et al.*, 2010). Otra forma de estimar la actividad biológica en el suelo es a través de la medición integral de la respiración del suelo o respiración edáfica basal. Para ello se emplean métodos respirométricos que determinan la cantidad de  $CO_2$  como producto del metabolismo de la fauna, de las raíces de las plantas y de la degradación de la materia orgánica, siendo éste último, el proceso más importante que lo genera. Este último, es un método indirecto de cuantificación y caracterización de la actividad metabólica de microorganismos en el suelo, que mide la velocidad de consumo de oxígeno o la velocidad de formación de  $CO_2$  lo cual está directamente relacionado con la cantidad de microorganismos en el suelo (Guerrero-Ortiz *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

## 2.5. Factores que Determinan la Composición de la Microbiota de la Rizosfera

La dinámica y distribución del microbioma de la rizosfera está condicionado por el tipo de suelo, el genotipo y la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta, además de los exudados liberados por las raíces de las plantas, los diferentes factores ambientales y sistemas de manejo agrícola (Pinto y Gomes, 2016). Las propiedades fisicoquímicas del suelo (la textura, el contenido de materia orgánica, minerales y el pH) y las condiciones ambientales, impulsan el desarrollo de una comunidad microbiana específica según el tipo de suelo (Philippot *et al.*, 2013). Las características fisicoquímicas complejas del suelo pueden modificar, tanto la fisiología de las plantas, como la morfología y los patrones de exudados radiculares lo que, a su vez, influye en la composición de la microbiota rizosférica. Estudios basados en la secuenciación del microbioma de *A. thaliana* han demostrado diferencias importantes en la microbiota que reside en las raíces, inducidas fuertemente por el tipo de suelo. Sin embargo, también se han observado comunidades de actinobacterias similares en la rizosfera de plantas de fresa pese a que están cultivadas en

diferentes tipos de suelo, lo que indica que, en este caso, el genotipo de la planta es un factor más determinante sobre la estructura y composición de las comunidades microbianas (Philippot *et al.*, 2013). Otro estudio de la composición filogenética bacteriana de tres cultivares de papa en dos sitios de campo distantes, demostró la presencia de un total de 2432 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs), de las cuales el 65 % se encontraron en la rizosfera de todos los cultivares en ambos campos. Estos resultados subrayan no solo la importancia del suelo en la determinación de las comunidades de la rizosfera, sino también que algunos microbios tienen una afinidad particular por ciertos genotipos de plantas (Berendsen *et al.*, 2012).

## 2.6. Exudados Radiculares

Otro de los factores claves que influyen en la composición del microbioma de la raíz son los exudados radiculares. La rizosfera se encuentra fuertemente influenciada por el metabolismo de las plantas, por la liberación de este tipo de compuestos orgánicos (exudados) y desechos de la planta (células muertas, mucílago en descomposición, etc.), a través del proceso conocido como rizodeposición (Dessaux *et al.*, 2016). Los exudados radiculares, incluidas las fitohormonas, facilitan las interacciones de la rizosfera sirviendo como fuentes de energía para los microorganismos, al actuar como atrayentes químicos y repelentes, constituyendo otro de los factores que determinan la composición de la microbiota edáfica asociada a plantas (Ahkami *et al.*, 2017). De este modo, la rizosfera proporciona un nicho muy atractivo y rico en nutrientes para los microbios, donde las interacciones de ambas partes también se ven favorecidas por la necesidad de un transporte altamente activo de agua y moléculas solubles por parte de las raíces (Philippot *et al.*, 2013; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Vega-Ávila *et al.*, 2015).

Los cantidad y composición de los exudados liberados por las plantas puede variar según el genotipo, la etapa de desarrollo en que se encuentre el vegetal y el estrés abiótico, según estudios realizados en *A. thaliana* (Sasse *et al.*, 2018). Generalmente, los exudados radiculares se dividen en dos clases: los más diversos son los compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, azúcares, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios; mientras que los de alto peso molecular (mucílago y proteínas) son menos diversos, pero componen una mayor proporción de

los exudados por masa. La magnitud de liberación de los fotosintatos varía en función del tipo de suelo, la edad, el estado fisiológico de la planta y la disponibilidad de nutrientes, además, son transportados a través de la membrana celular y secretados alrededor de la rizosfera (Bais *et al.*, 2006).

Las plantas pueden determinar la composición del microbioma de la raíz mediante la secreción activa de moléculas de señalización, atrayentes, estimulantes, pero también como inhibidores o repelentes (Baetz y Martinoia, 2014). Por lo tanto, la composición de los exudados de la raíz, que se encuentra bajo el control genético del hospedero, probablemente define el ensamblaje de comunidades microbianas de la rizosfera de la raíz y la planta específica (Berendsen *et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018).

La secreción de ácidos cítrico, succínico y málico es común en las semillas, plántulas y raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) y pimiento dulce (*Capsicum annuum*). En el caso particular del ácido cítrico, éste es utilizado por algunas rizobacterias como fuente de carbono para crecer *in vitro*, lo que parece relacionarse con su capacidad de colonizar raíces (Berendsen *et al.*, 2012). Las plantas de cereales, como el maíz (*Zea mays*), secretan algunos compuestos antimicrobianos como el DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona), para su defensa contra patógenos. Una rizobacteria que beneficia el crecimiento vegetal, *Pseudomonas putida* (KT2440), es atraída por quimiotaxis hacia las raíces a través de este compuesto (Neal *et al.*, 2012; Berendsen *et al.*, 2012). De este modo, las plantas que producen benzoxazinoides albergan una microbiota diferente a las que no lo producen y son capaces de acondicionar el suelo y aumentar los niveles de hormonas (ácido jasmónico y salicílico). Estas hormonas están involucradas en la activación de los mecanismos de defensa de la planta ante la incidencia de patógenos, pero también ante situaciones de estrés por salinidad, altas o bajas temperaturas, cambios de pH en el suelo, así como en la competencia por agua y nutrientes con otros vegetales (Hu *et al.*, 2018).

Los exudados de la raíz son críticos para el desarrollo de asociaciones entre poblaciones microbianas del suelo, pueden inhibir el crecimiento de especies de plantas competidoras, facilitan las simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos micorrízicos y previenen ataques patógenos de bacterias, hongos e insectos (Ahkami *et al.*, 2017). Por otro lado, pueden desempeñar funciones indirectas importantes en la competencia por recursos al alterar la química del suelo y las poblaciones microbianas (Bais *et al.*, 2006). Algunas plantas desarrollan raíces densamente

compactadas, lo que les permite vivir en suelos extremadamente pobres en nutrientes por la capacidad que tienen estas raíces de exudar grandes cantidades de ácidos orgánicos y protones que ayudan a solubilizar nutrientes.

## 2.7. Influencia de Factores Edáficos y Climatológicos

Un amplio rango de factores edáficos y climatológicos pueden dirigir la composición y distribución del microbioma de las plantas. Algunas propiedades como el pH, la textura del suelo, el contenido de agua, la concentración de carbono y nitrógeno y su relación (C:N), así como la concentración de algunos metales pesados (Al, Mg, Mn) y la cantidad de arcilla, hacen que varíen las características de las micro comunidades y su composición, con gran impacto en la supervivencia y adaptación de distintas especies (Copeland *et al.*, 2015; Zorraonaindia *et al.*, 2015). En el caso particular de las vides, los factores edáficos y la localización geográfica (altitud y latitud) provocan variaciones significativas en la composición de las poblaciones bacterianas y en general, de todo el microbioma del viñedo (Eilers *et al.*, 2012; Bevivino *et al.*, 2014; Burns *et al.*, 2015). Con la profundidad del suelo, algunas propiedades, como el pH, puede aumentar y con ello disminuir las concentraciones de carbono orgánico y la diversidad bacteriana (Eilers *et al.*, 2012). Se ha observado que, en suelos de viñedos con diferencias en cuanto a la latitud, topografía y precipitaciones, las comunidades microbianas reflejan aumentos en la abundancia relativa de algunos taxones como *Actinobacteria* y *Planctomycetes*, así como una disminución de *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes*. Estos cambios se han relacionado con el contenido de N y C del suelo que provocan estas variables geográficas (Burns *et al.*, 2015).

## 2.8. Análisis de la Composición de la Microbiota de la Rizosfera

El análisis de la microbiota de los suelos y las interacciones planta-microorganismo permiten desarrollar nuevos enfoques para mejorar la sanidad de los cultivos y aumentar la productividad de

distintos suelos agrícolas de una forma más sostenible (Pinto *et al.*, 2016). Para el estudio de la estructura de las comunidades microbianas, así como la variación espacial y temporal, comúnmente se han empleado técnicas microbiológicas tradicionales; estas técnicas incluyen medios de cultivo formulados con los requerimientos nutricionales y de energía para microorganismos cultivables (Hamady *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2017). Sin embargo, el análisis de las respuestas y adaptaciones de los microorganismos en suelos es complejo, lo que requiere un análisis exhaustivo del genoma de los organismos tanto cultivables, como no cultivables presentes en la rizosfera (Morrison-Whittle *et al.*, 2017; Trouvelot *et al.*, 2015). Para ello, el advenimiento de nuevas técnicas en el campo de la biología molecular ha marcado un cambio significativo en el estudio de comunidades microbianas complejas, con lo que se ha podido obtener una mayor visión de lo diversos que son los ecosistemas terrestres (Cocolin *et al.*, 2013).

### **2.8.1. Técnicas Tradicionales para el Estudio de Comunidades Microbianas**

El estudio de las poblaciones microbianas en sus inicios se basó en el uso de técnicas convencionales dependientes del cultivo *in vitro*, para la caracterización morfológica y bioquímica de organismos procariotas y eucariotas. Para medir la biomasa fúngica activa en el suelo, se han utilizado técnicas de microscopía de fluorescencia y contraste de fases, por su utilidad en la medición de la longitud de las hifas fúngicas teñidas y el total de hifas en muestras de suelo. También a través de microscopía de recuento directo y tinción con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se ha podido determinar la biomasa bacteriana en este tipo de ecosistemas. A pesar de ser sencillos, estos métodos de bajo costo y fácil realización en el laboratorio, pueden subestimar la biomasa microbiana real cuando ésta es muy baja, lo que generalmente ocurre en ecosistemas áridos (Ingham y Klein, 1984; Vázquez *et al.*, 2016b).

La diversidad de los microorganismos edáficos se analizaba a partir de técnicas para el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en placas, pruebas bioquímicas en medios de cultivo formulados especialmente para ello. De esta forma, algunas bacterias Gram positivas (*Bacillus* sp, *Clostridium* sp), Gram negativas (*Pseudomonas* sp, *Agrobacterium* sp, *Rhizobium* sp) y *Actinobacterias* (*Streptomyces* sp) se consideraban los procariotas típicos del suelo (Nogales,

2005). Sin embargo, la caracterización de la microbiota edáfica a través de estas técnicas convencionales se dificulta debido a que aproximadamente sólo un 1 a 10% de los microorganismos del suelo pueden crecer en medios de cultivo, bajo diferentes condiciones de temperatura, luz y pH (Torsvik *et al.*, 2002; Killham y Prosser, 2014; Abdelfattah *et al.*, 2018), siendo técnicas poco representativas y de baja reproducibilidad. Además, estas pruebas en muchos casos son laboriosas y pueden requerir de varios días para obtener resultados.

### **2.8.2. Técnicas Moleculares Independientes de Cultivo**

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido el acceso a una mayor información sobre la estructura y las funciones de las poblaciones microbianas en diferentes hábitats. Con relación a los métodos tradicionales, tienen la ventaja que, reducen el tiempo necesario para procesar una muestra, no requieren del cultivo de microorganismos, brindando información de microorganismos cultivables y no cultivables, y aumentan la capacidad de resolución (Miki *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2016). Los primeros estudios moleculares se basaron en el análisis de la información genética a través de técnicas electroforéticas como DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización), ARDRA (Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado), RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), RADP (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) entre otras (Cortez-López *et al.*, 2014). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y la identificación de marcadores moleculares evolutivamente estables, como los genes del ARN ribosomal, han permitido identificar distintas especies con mejor resolución y confiabilidad (Wang *et al.*, 2014). La subunidad ribosomal pequeña 16S (ARNr 16S) así como los genes fúngicos ITS 1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés) se han reconocido como estándares para estimar la diversidad filogenética de comunidades microbianas (Cocolin *et al.*, 2013).

La evolución de técnicas de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, de secuenciación masiva y de ensamblado de secuencias, han hecho posible el desarrollo de la metagenómica (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Cortez-López *et al.*, 2014), herramienta que se utiliza ampliamente para el estudio de estructuras y vías metabólicas de poblaciones microbianas a partir de una muestra

ambiental, sin necesidad de un cultivo previo (Wooley y Ye, 2007., Kaur *et al.*, 2018; Abdelfattah *et al.*, 2018). La secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) permite determinar el orden de los nucleótidos de forma masiva en paralelo y con un alto rendimiento de amplicones. Las lecturas de secuencias son analizadas con herramientas bioinformáticas para identificar los genes y su posición taxonómica en el caso de genes de ARNr (Fantini *et al.*, 2015). Las tecnologías de NGS más comunes son: 454 de Roche (pirosecuenciación), Ion Torrent PGM e Illumina Sequencing (Bragg y Tyson, 2014). Las secuencias de ARNr 16S de diversos microorganismos, cultivables o no, se han reportado en bases de datos como GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project) con una información amplia. Del mismo modo, la amplificación de secuencias de organismos no cultivables, obtenidas de muestras ambientales, ha llevado al descubrimiento de nuevos grupos taxonómicos. Los análisis metagenómicos brindan información más completa de la estructura, la riqueza y distribución de las comunidades microbianas (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016) y posibilitan una visión mucho más extensa de las capacidades de respuesta y adaptación de los microorganismos que interactúan con las raíces de algunos cultivos, en distintas épocas y condiciones (Rossouw *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015). Esta tecnología ofrece una imagen más fiel y profunda de estas comunidades que la que se obtiene utilizando métodos de cultivo o microscópicos, lo que ha permitido develar una biodiversidad que no había sido descrita anteriormente (Pinto y Gomes, 2016).

## 2.9. La Microbiota Rizosférica en Vid

Algunos estudios demuestran que la microbiota rizosférica en suelos de viñedos varía, dependiendo del tipo de manejo aplicado. La abundancia y diversidad de endófitos fúngicos en las raíces de vides sufrieron cambios según el tratamiento orgánico y convencional al que fue sometido un viñedo, en estudio realizado por Radic *et al.* (2014), observaron una colonización micótica generalmente más alta en los viñedos con manejo orgánico, demostrando que, el cambio en el manejo del suelo del viñedo hacia prácticas más sostenibles mejora la abundancia y la diversidad de hongos endófitos, los que, a su vez, pueden mejorar la toma de nutrientes de la planta y su

fisiología. Por otro lado, Vega-Ávila *et al.*, (2015) describieron el microbioma de la rizosfera de la vid cultivada bajo prácticas convencionales y orgánicas, usando una combinación de enfoques independientes del cultivo. La cuantificación del ARNr 16S bacteriano y genes relacionados con la fijación del nitrógeno por PCR cuantitativo (qPCR) reveló cantidades similares de estos genes en la rizosfera en ambos viñedos. Estos enfoques se complementaron con una secuenciación de alto rendimiento basada en la región V6 del gen 16S RNAr. Se identificaron como principales grupos de bacterias en la rizosfera de la vid los géneros: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Cloroflexi*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*.

Zarraonaindía *et al.*, (2015) estudiaron la influencia de diferentes cultivares de vid, los parámetros edáficos y las etapas de desarrollo de la planta en la dinámica espacial y temporal de las comunidades microbianas presentes en órganos (raíces, fruto, hojas) y en el suelo. Sus resultados reflejaron una diversidad bacteriana mayor en las muestras provenientes del suelo (no influenciado por raíces) respecto a las muestras provenientes de partes aéreas de la vid. Asimismo, una buena parte de los microorganismos provenientes del suelo se encontraban en diversos órganos de la vid lo que sugiere que el suelo actúa como un reservorio natural de una gran diversidad de especies microbianas, algunas de las cuales pueden atravesar las paredes celulares de las raíces de las plantas e incluso distribuirse a través de los sistemas vasculares a diferentes órganos.

Castañeda y Barbosa (2016) caracterizaron la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades microbianas presentes en suelos de viñedos en Chile recolectando, además, muestras de suelo de bosque nativo circundante, para establecer comparaciones del mismo antes del establecimiento de los viñedos. Observaron que el filo *Proteobacteria* fue más abundante, tanto en suelos vírgenes, como en aquellos provenientes de viñedos, seguido de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Planctomycetes*, sin presentar diferencias entre ambos suelos.

Morrison-Whittle *et al.* (2017) evaluaron el efecto neto del manejo convencional con respecto al biodinámico en ecosistemas de viñedos mediante la cuantificación y análisis de la biodiversidad de las comunidades fúngicas presentes en múltiples hábitats (suelo, corteza, fruto y jugo) mediante técnicas de metagenómica. Las diferencias más notables se encontraron a nivel de especie y en relación a la estructura y composición de las comunidades de hongos en el suelo y en el fruto, al comparar ambos sistemas de manejo de cultivo.

## 2.10. Tipos de Manejo de Cultivo (Estrategias para Aumentar la Producción del Cultivo)

La implementación de nuevas tecnologías y sistemas de manejo para aumentar la producción agrícola pueden tener efecto directo sobre la microbiota edáfica. Los suelos que son sometidos a perturbación por la labranza profunda pueden ser más susceptibles a la reducción de su microbiota debido a la desecación, la destrucción mecánica, la compactación del suelo y reducción de porosidad, a diferencia de aquellos suelos en los que se realizan siembras directas de cultivos extensivos (Feng *et al.*, 2003; Morrison-Whittle *et al.*, 2017).

El modelo de agricultura convencional se basa en un sistema de producción de eficiencia que depende de un alto uso de insumos sintéticos. Las técnicas no sostenibles de manejo de cultivo han demostrado ser inadecuadas debido al empleo de tecnologías mecanizadas (tractores, cultivadoras, sembradoras) que causan considerables reducciones de la biodiversidad microbiana (García *et al.*, 2013). La aplicación de fertilizantes, pesticidas y otros productos de síntesis química, al igual que los procesos de labranza profunda utilizada en algunos sistemas agrícolas, debilitan la resistencia natural de los suelos a enfermedades y plagas, y alteran las características físicas y químicas en estos ecosistemas (Radic *et al.*, 2014; Lange *et al.*, 2015); además, pueden provocar acidificación del suelo y, con ello, la pérdida de algunas poblaciones fúngicas incluyendo los HMA que abundan en las raíces de las vides y otros cultivos, (O'Donnell *et al.*, 2001; Chi-Chu, 2010; Muñoz-Leoz *et al.*, 2012).

En ecosistemas de viñedos, en particular, debido a los cambios que pueden ocasionar las distintas prácticas de manejo de cultivo sobre los sistemas de raíces, las características del suelo y en general, en la estructura y diversidad microbiana en la rizosfera, se aplican algunas medidas para evitar la pérdida de biodiversidad y efectos indeseados en la productividad del cultivo. Una de estas medidas consiste la aplicación de fungicidas a base de cobre, como el hidróxido de cobre II ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) y el oxiclорuro de cobre ( $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ ), a una concentración que impida su acumulación y disponibilidad para otros organismos (White, 2009., Hinojosa *et al.*, 2010). A pesar de ser un micronutriente importante, el Cu puede resultar tóxico cuando sus concentraciones son muy altas, provocando cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos en las plantas, disminuyendo, tanto la productividad, como la calidad de los alimentos. Los ápices de las raíces se vuelven más cortos y gruesos provocando cambios en la pared celular, aumenta el número de raíces laterales y la

plasmólisis, y otras consecuencias, que pueden causar contracción de la raíz y disminuir la absorción de agua y otros nutrientes (Chen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). En bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, el exceso de Cu causa una mayor absorción de Fe y S debido a una disminución de la estabilidad de los grupos Fe-S durante la biogénesis o cuando se unen a sus proteínas objetivo (Chillappagari *et al.*, 2010). En condiciones aeróbicas, Cu cataliza reacciones que resultan en la producción de radicales hidroxilos o especies reactivas de oxígeno (ROS) altamente reactivos, responsables de la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y el daño a los ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 1990; Stadtman, 1992; Brunetto *et al.*, 2016). Por estas razones se evita uso excesivo de fungicidas a base de cobre en los suelos agrícolas.

La gestión orgánica y regenerativa de suelos ha sido ampliamente considerada por conferir efecto positivo sobre la biología del suelo, dando lugar a un mayor nivel de actividad biológica. Todo esto incluye la reducción de métodos como la labranza, la aplicación de nutrientes y la eliminación de pesticidas y herbicidas (Vega-Ávila *et al.*, 2015). El sistema de manejo orgánico de los cultivos, y en especial de los viñedos, proporciona mejores condiciones para sustentar una mayor diversidad de microorganismos en la rizosfera, lo que resulta beneficioso para estos cultivos debido a que la interacción entre diversas especies aumenta el número de pelos radicales y, en general, mejora las características de sus raíces, la fisiología de la planta y su productividad (Radic *et al.*, 2014; Likar *et al.*, 2017).

## 2.11. Bioestimulantes

Dentro de las iniciativas para la mejora de la agricultura se encuentra el empleo de productos de origen natural, entre los que se destacan los bioestimulantes. Kauffman *et al.*, (2007) introdujeron por primera vez el término bioestimulante como “sustancias que están disponibles en una variedad de formulaciones y con diferentes ingredientes, que generalmente se clasifican en tres grupos principales en función de su fuente y contenido. Estos grupos incluyen sustancias húmicas (HS), productos que contienen hormonas (HCP) y productos que contienen aminoácidos (AACP). Los HPSs, como los extractos de algas marinas, contienen cantidades identificables de sustancias activas para el crecimiento de las plantas, como las auxinas, las citoquininas o sus derivados ”.

Según el Consejo Europeo de la Industria del Bioestimulante (EBIC, 2016) “Los bioestimulantes de las plantas se definen como sustancias o microorganismos cuyas funciones, cuando se aplican a las plantas o la rizosfera, son estimular los procesos de crecimiento natural al mejorar la absorción de nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad del cultivo”. Además, una característica importante es que al ser aplicados a la planta o a sus raíces, estimulan los procesos naturales para mejorar la fisiología vegetal y no tienen acción directa contra las plagas u otros fitopatógenos (Calvo *et al.*, 2014).

A pesar de los esfuerzos por aclarar el estado regulatorio de los bioestimulantes, aún no existe una definición legal ni una lista detallada de estos productos. No obstante, se reconocen por parte de científicos y reguladores, algunas categorías como los (i) ácidos húmicos y fúlvicos, (ii) hidrolizados de proteínas y compuestos nitrogenados, (iii) extractos de algas marinas y botánicos, (iv) así como microorganismos (bacterias y hongos) beneficiosos. Los ácidos húmicos y fúlvicos son constituyentes naturales de la materia orgánica del suelo que resultan de la descomposición de residuos de plantas, animales y microorganismos, pero también de la actividad metabólica de microorganismos que utilizan los residuos agrícolas como sustrato; generalmente, se emplean las fracciones solubles de estas sustancias húmicas para mejorar la nutrición de la raíz a través de mecanismos como el intercambio catiónico, lo que aumenta la toma de micro y macronutrientes, así como el incremento de la disponibilidad de P debido a la interferencia de los ácidos húmicos en la precipitación del fosfato de calcio (Jindo *et al.*, 2012).

Las mezclas de aminoácidos y péptidos se pueden obtener por hidrólisis química y enzimática de proteínas a partir de subproductos agroindustriales de fuentes vegetales (residuos de cultivos) y de desechos animales (por ejemplo, colágeno, tejidos epiteliales). Entre los compuestos nitrogenados se encuentran la betaína, poliaminas y aminoácidos no proteicos. En el caso específico de la glicina betaína es un compuesto presente en bacterias, cianobacterias, algas, animales. En plantas superiores se sintetiza en respuesta a condiciones de estrés abiótico (estrés hídrico o acumulación de sales), por lo que su aplicación exógena contribuye a las plantas tolerar altas concentraciones de sales (Chen y Murata, 2011). Tienen como efecto directo en las plantas, mediante la regulación de las enzimas involucradas en la asimilación de N y de sus genes estructurales, y al actuar sobre la vía de señalización de la adquisición de N en las raíces. Además, pueden regular las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (du Jardin, 2012; Calvo *et al.*, 2014).

A pesar de que el empleo de algas como fuente de materia orgánica y como fertilizantes es antiguo

en la agricultura, sus efectos bioestimulantes se han registrado recientemente (du Jardin, 2015). La mayoría de las algas pardas que se utilizan con este fin pertenecen a los géneros *Ascophyllum*, *Fucus* y *Laminaria*; a diferencia de los carragenanos que se originan a partir de algas rojas. Los extractos de algas se pueden aplicar como tratamientos foliares o en el suelo, donde incrementan el intercambio catiónico, la retención de agua y la aireación, además tienen efecto positivo en las bacterias que promueven el crecimiento vegetal y que residen en el suelo, aunado a esto, aportan nutrientes a las plantas y actúan en la germinación de semillas, en el establecimiento de la planta y su mejor desarrollo.

En el caso de los productos botánicos describen sustancias que son extraídas de plantas. El conocimiento sobre sus modos de acción y su composición es escaso (Seiber *et al.*, 2014). No obstante, se sabe que a partir de algunos vegetales se pueden obtener algunos ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (<200 g/mol aniónico) que les permite tener una amplia movilidad en el suelo y en las plantas y, de esta manera, influir en la síntesis de metabolitos de transporte, el transporte de nutrientes hacia los sitios de demanda, el aumento de la actividad respiratoria y, por tanto, una mayor energía en las células de la raíz, así como la inducción de la síntesis de nuevos ácidos carboxílicos (Guerrero *et al.*, 2007).

El empleo de bioproductos conteniendo microorganismos benéficos ha tenido especial interés en la agricultura. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) constituyen un grupo heterogéneo de taxones que se asocian con diferentes plantas, penetrando las células corticales de la raíz y formando las estructuras ramificadas llamadas arbusculos. Se consideran los múltiples beneficios del empleo de micorrizas para promover la agricultura sostenible, considerando los beneficios de la simbiosis (incremento de la toma de micro y macronutrientes, especialmente el P, el equilibrio hídrico, la protección contra el estrés biótico y abiótico de las plantas). También hay hongos endófitos como *Trichoderma* sp. que inducen muchas respuestas de las plantas, incluida una mayor tolerancia al estrés abiótico, la eficiencia del uso de nutrientes, crecimiento de los órganos y la morfogénesis (Colla *et al.*, 2015). Los hongos, a través de sus hifas, forman asociaciones tripartitas con plantas y rizobacterias (PGPR), estas últimas, también empleadas como inoculantes en la agricultura, que mejoran la nutrición y crecimiento, morfogénesis y desarrollo, respuesta al estrés biótico y abiótico en plantas (Philippot *et al.*, 2013).

La aplicación de los bioestimulantes en las plantas o en la rizosfera modifica su fisiología y posiblemente también afecta la estructura de las comunidades microbianas que están presentes en

el suelo. Es por ello que, además de evaluar su efecto a nivel de la fisiología vegetal, y productividad de los cultivos, se hace necesario el monitoreo su impacto sobre la diversidad de la microbiota edáfica.

### **3. HIPÓTESIS**

La aplicación de bioestimulantes en cultivos de vid (*Vitis vinífera*), modifica la estructura y diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos rizosféricos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Caracterizar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos rizosféricos de vid, con y sin aplicación de bioestimulantes, en dos etapas fenológicas del cultivo.

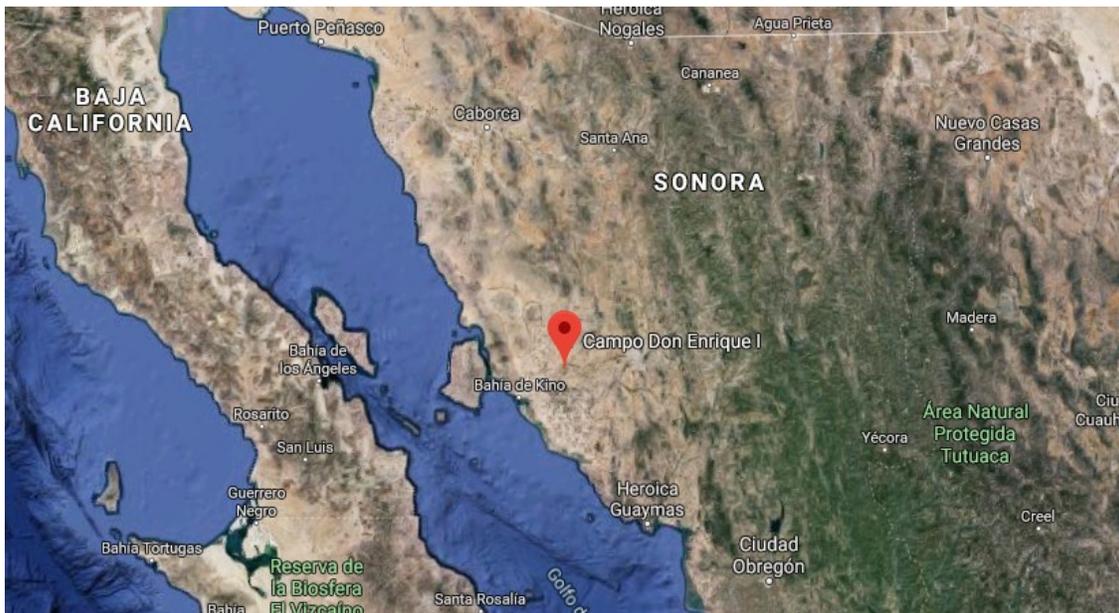
### **4.2. Objetivos Específicos**

1. Caracterizar y cuantificar las poblaciones microbianas en suelos rizosférico y no rizosférico de vid mediante métodos directos (cuenta en placa y qPCR) e indirectos (actividad deshidrogenasa (DH) e hidrólisis de diacetato de fluoresceína (DAF)).
2. Analizar la composición relativa de las comunidades microbianas presentes en suelos cultivados con vid, mediante técnicas metagenómicas.
3. Estimar los diferentes índices de diversidad de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de la vid.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Área de Estudio y Toma de Muestras

El estudio se llevó a cabo en un viñedo ubicado en el campo Don Enrique, en la Costa de Hermosillo, Sonora ( $28^{\circ}59'13.3''N, 111^{\circ}32'27.4''W$ ) (Fig. 2). La región tiene un clima desértico semicálido, con una temperatura media de  $23.9^{\circ}C$  y precipitaciones de 124.7 mm al año que ocurren principalmente en los meses de julio y agosto. El suelo en el sitio de estudio es de tipo Regosol, son suelos poco desarrollados, de textura media, con bajo porcentaje de materia orgánica (INEGI, CESAVE-SIAFESON, 2019) (Anexo 1a y y 1b).



**Figura 2.** Localización geográfica del viñedo en estudio, ubicado en el campo Don Enrique, Agrícola Alta, Costa de Hermosillo, Sonora ( $28^{\circ}59'13.3''N, 111^{\circ}32'27.4''W$ ).

El manejo del cultivo de uva de mesa en el campo donde se realizaron los ensayos comprendió el uso regular de herbicidas, fungicidas, nematicidas, fertilizantes y productos para pigmentar las

bayas, a través del sistema de riego por goteo (Anexo 2). El tratamiento evaluado en el presente estudio consistió en la aplicación de dos bioestimulantes (ExuRoot® + Nutrisorb®, Innovak Global, México) que estimulan la liberación de exudados radiculares y la absorción activa de nutrientes a través del crecimiento de raíces secundarias y pelos absorbentes, respectivamente. Se tomaron muestras de suelo y de raíces de *Vitis vinifera* var. Flame, durante la etapa de brotación y poscosecha del cultivo. Después de la primera toma de muestras, se aplicaron 5L/ha de la mezcla de bioestimulantes (2:1 v/v). Los tratamientos se aplicaron través del sistema de riego por goteo cada 15 días, durante el período de marzo a agosto de 2018 (Anexo 3). Ambas etapas fenológicas corresponden al estado de mayor actividad radicular del cultivo de vid. Se muestrearon dos parcelas de 1 Ha (testigo y tratada), cada una dividida en cuatro bloques de los cuales se seleccionaron tres al azar (n=3) (Anexo 4a). Cada muestra estuvo compuesta por suelo y raíces de 7 plantas. Los núcleos de suelo (aproximadamente de 20-30 cm de alto x 10 cm diámetro), fueron tomados debajo de la capa más superficial de suelo (2-5 cm). Las muestras de suelo no rizosférico fueron extraídas entre las hileras de las vides (Anexo 4b). Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico estériles y trasladadas al laboratorio en hieleras conteniendo bolsas de hielo en gel. Posteriormente, los suelos se tamizaron con una malla de 2 mm para eliminar restos de raíces grandes y se almacenaron a 4°C para el ensayo de actividad microbiana en el suelo y análisis microbiológicos por métodos de cultivo in vitro, mientras que, para análisis metagenómicos, se conservaron a -20 °C.

## 5.2. Extracción de Muestras de Rizosfera y Rizoplano

Las raíces se lavaron con 200 mL de una solución buffer de fosfatos (NaCl 130 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3mM, pH 7) mezclado con un surfactante, PBS-Silwet Maxx (0.02% v/v) (Arista Life Science, México). Se mantuvieron en agitación en una placa (250 rpm) a 4°C durante 20 minutos y se centrifugó durante el mismo tiempo a 5000 rpm. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue transferida a un tubo Falcon de 50 mL etiquetado como muestra de rizosfera (R). Después del primer lavado, fueron sometidas al mismo procedimiento más 10 ciclos

de sonicación (160W, 30 min) para la obtención de muestras de rizoplano (Rp) (Lakshmanan *et al.*, 2017).

### 5.3. Actividad Microbiana en Suelo no Rizosférico y Rizosférico

#### 5.3.1. Hidrólisis de di-acetato de Fluoresceína

Se evaluó la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (DAF) en suelo no rizosférico y rizosférico como un indicador sensible de la actividad microbiana (Adam y Duncan, 2001) y una medida indirecta de la cantidad total de microorganismos viables. Para ello, se colocaron 2 g de suelo no rizosférico (peso fresco, tamizado <2 mm) en matraces de 50 mL y se añadieron 15 mL de tampón de fosfatos (60 mM, pH 7.6) y 0.2 mL de una solución madre de di-acetato de fluoresceína (DAF 1000 µg/mL). Blanco: sin adición del sustrato DAF (con el volumen equivalente de agua destilada). Los matraces fueron tapados y agitados manualmente, posteriormente se incubaron a 30 °C, con agitación de 100 rpm durante 20 min. Luego de retirados de la incubadora, se adicionaron 15 mL de cloroformo/metanol (2:1 v/v) en campana de extracción para terminar la reacción. El contenido de los matraces se transfirió a tubos de 50 mL para realizar una centrifugación a 2000 rpm durante tres minutos. El sobrenadante de cada muestra se filtró con papel Whatman 2 en matraces cónicos de 50 mL y se midió la absorbancia a 490 nm (Espectrofotómetro Jenway).

Para determinar la hidrólisis de DAF en suelo rizosférico se añadieron 0.25 g de muestra y se siguió la metodología descrita anteriormente, modificando los volúmenes de reactivos según la cantidad de muestra empleada. La concentración de fluoresceína liberada se calculó teniendo en cuenta los datos obtenidos de la curva de calibración de fluoresceína (0, 1, 2, 3, 4, 5 µg de fluoresceína/mL) que se preparó a partir de una solución estándar de 20 µg de fluoresceína/mL (Adam y Duncan, 2001).

### 5.3.2. Actividad Deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa (ADH) en suelo no rizosférico y rizosférico se evaluó siguiendo el método descrito por Klein *et al.* (1971). A 1 g de suelo de las muestras compuestas (peso fresco, tamizado <2 mm), se le adicionaron 0.2 mL de una solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC, SIGMA) al 3% (p/v) y 0.5 mL de una solución de glucosa (SIGMA) al 0.5% (p/v) en tubos de 50 mL. Se incubó a 27°C en condiciones de oscuridad, durante 24h. Terminado el tiempo de incubación, se añadieron 10 mL de metanol a cada uno de los tubos, mezclando vigorosamente para extraer el formazán producto de la reacción. Se centrifugó a 5000 rpm (centrífuga HERMLE) durante 15 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 485nm (Espectrofotómetro Jenway). Todo el experimento se realizó por triplicado con su respectivo blanco, para el cual se sustituyó la solución de TTC al 3% por agua destilada. Para determinar la ADH en suelo rizosférico se añadieron 0.25 g de muestra y se siguió la metodología descrita anteriormente, modificando los volúmenes de reactivos según la cantidad de muestra empleada. Las concentraciones de formazán extraído se calcularon teniendo en cuenta los datos obtenidos con una curva estándar de TTC-formazán (0,5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL de metanol). La actividad de la deshidrogenasa en suelo rizosférico y no rizosférico se expresó como µg de TTC-formazán/g de suelo producidos en 24 h.

### 5.4. Cuento de Microorganismos Cultivables en el Suelo

El conteo de microorganismos cultivables se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación y Desarrollo, Innovak Global, Chihuahua, México. Para la cuenta de hongos se estableció la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM 111-SSA-1994, con la adición de 2g de muestra de suelo en matraces que contenían 18 mL de medio de cultivo líquido (Caldo extracto de malta y Caldo Sabouraud). Los matraces se mantuvieron en agitación de 12 a 48 h y se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) para su posterior inoculación por duplicado en placas de Petri con agar papa dextrosa. Las placas fueron incubadas a 28°C de 3 a 5 días. El conteo de bacterias viables

se realizó por el método de dilución en placas según la NOM-092-SSA1-1994. Para ello se adicionaron 2 g de cada muestra de suelo en matraces con 18 mL de medio de cultivo líquido: Caldo Soya Triptona (CST) y Luria-Bertani (LB). Se mantuvieron en agitación orbital por 12 horas y posteriormente se hicieron diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ). Se sembraron 10  $\mu$ l de cada dilución en placas Petri empleando Agar Soya Triptona (AST) como medio de cultivo general y Agar Cetrimide (AC), específico para el aislamiento de *Pseudomonas* sp, luego fueron incubadas las placas en posición invertida a 28 y 35°C de 3 a 5 días. La preparación y dilución de las muestras se hicieron según las NOM 110-SSA 1- 1994 y los resultados se expresaron en UFC/g de suelo.

### 5.5. Conteo de Nemátodos

Se emplearon las técnicas de trampeo o uso de cebos descrita por Dhingra y Burton, 1995 y matriz-centrifugado para la extracción de nemátodos y huevecillos (Gooris y Dérde, 1969). La cantidad de nemátodos presentes en el suelo se expresó como cantidad de individuos/100 cc de suelo.

### 5.6. Extracción y Secuenciación de ADN Metagenómico

El ADN total de las muestras de suelo no rizosférico, rizosfera y rizoplaneo, previamente descongeladas, fue extraído utilizando el kit de extracción Powersoil® DNA isolation kit (Mbio, Carlsbad, CA, USA), según las instrucciones del fabricante. Este sistema de extracción garantiza una ruptura eficiente de las estructuras celulares, evita el color oscuro de las muestras y remueve inhibidores de PCR que pueden estar presentes en el suelo. La concentración de ADN genómico se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda 260 nm en un espectrofotómetro Nano Drop (Thermo Scientific). Para la pureza se verificó que la relación de absorbancias 260/280 tuviesen valores en un rango de 1.7-2.0. Valores fuera de este rango indican la presencia de contaminantes, como ácidos húmicos y fúlvicos y otros compuestos fenólicos (Castillo-Monroy *et al.*, 2016). La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con

amortiguador TAE 1X. La región V3-V4 del gen ribosomal 16S se amplificó utilizando los cebadores directo

(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) y reverso (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) para la construcción de bibliotecas de amplicones metagenómicos y se llevó a cabo la secuenciación del ARNr 16s a través de la plataforma Illumina MiSeq (Instituto de Biotecnología, UNAM).

#### 5.6. Cuantificación Absoluta de Bacterias y Hongos Mediante PCR en Tiempo Real (qPCR)

Se realizó la amplificación y cuantificación total de ADN presente en las muestras de suelo, rizosfera y rizoplano, mediante qPCR utilizando el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Denmark) según las instrucciones del fabricante, con un protocolo estandarizado para la cuantificación absoluta de ADN genómico. Para cada reacción se utilizaron dos réplicas técnicas con un volumen total de 20  $\mu$ L cada una, conteniendo 2  $\mu$ L de ADN de cada muestra, 10  $\mu$ L de 1X Master Mix proporcionado en el kit, 0.4  $\mu$ L de cada uno de los cebadores (200 $\mu$ M) y 7.2  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Para la cuantificación de bacterias se utilizaron los cebadores 338F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') y 518R (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3') que amplifican la región V4-V5 del gen ribosomal ARNr 16S (Bakke *et al.*, 2011). Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de detección de PCR en tiempo real (Rotor-Gene 2.1.0.9) con los siguientes parámetros de ciclo: una etapa de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineamiento a 50 °C, 30 s de extensión a 72 °C. Para hongos se emplearon los cebadores NL1F (5'ATATCAATAAGCGGAGGAAAG 3') y LS2R (5'ATTCCCAACTCGACT) para la amplificación del gen ribosomal ARNr 18S (O'Donnell *et al.*, 1993; Cocolin *et al.*, 2000) bajo las condiciones de corrida siguientes: una etapa de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineamiento a 52 °C, 30 s de extensión a 72 °C.

El ciclo de PCR en el que la fluorescencia excedió el umbral se definió como el ciclo umbral (Ct). La cuantificación absoluta se realizó comparando los valores de Ct de las muestras desconocidas con una curva estándar de concentración conocida, expresando la cantidad total de hongos y bacterias como el número de copias de los genes ARNr 18S y 16S, respectivamente. Para cada reacción de amplificación se tomaron valores de  $R^2 > 0.99$ , con una eficiencia  $> 75\%$ .

### 5.7. Análisis Estadístico

Se analizaron las diferencias de las actividades enzimáticas, el conteo de los principales grupos microbianos y la cantidad absoluta de hongos y bacterias entre las muestras (suelo no rizosférico, rizosfera y rizoplano) en la etapa de brotación (sin tratamiento) y en periodo de poscosecha (con y sin tratamiento). Para ello se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, a partir de un diseño completamente al azar (DCA). La comparación de medias se hizo a través del método LSD de Fisher considerando un nivel de significancia de  $\alpha < 0.05$ .

Se realizaron análisis de correlación de Pearson entre el total de bacterias y hongos, la actividad microbiana en suelos no rizosférico y rizosférico, así como la cantidad de nematodos presentes en el suelo no rizosférico.

Todos los datos se analizaron en el paquete estadístico Number Cruncher Statistical Systems 2007 (NCSS, Kaysville, UT) software (Hintze, 2007).

### 5.8. Análisis Bioinformático

Para el análisis de secuencias metagenómicas se ensamblaron las lecturas complementarias para obtener secuencias de alta calidad para la agrupación de OTUs. Se realizó un recorte de las secuencias a 439 pb de longitud para eliminar las bases de baja calidad del extremo 3' y garantizar que todas las secuencias tengan la misma longitud. Basados en el número de lecturas, se filtraron las muestras con número de lecturas superior al 50% de la mediana, excluyendo aquellas que

tuvieron un número de lecturas demasiado bajo (<49762). Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) más abundantes se identificaron comparando con la base de datos de referencia Silva 16S versión 123 (Quast *et al.*, 2013) utilizando un 97% de similitud.

A partir de las tablas de abundancia de OTUs se estimaron los índices de Shannon, Simpson, Chao-1 y la diversidad filogenética, basados en la abundancia de las especies dentro de la muestra, realizando además el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las comparaciones medias entre las muestras se realizaron utilizando pruebas LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $\alpha < 0.05$ . Para el análisis de la diversidad  $\beta$  (entre las muestras) se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de la matriz de disimilitud de Bray Curtis y análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) para identificar las diferencias ( $\alpha < 0.05$ ) entre las muestras. Los análisis bioinformáticos se realizaron utilizando el programa CLC Genomics Workbench 9.0 complementado con CLC Microbial Genome Module 1.3 (Qiagen, Denmark).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Caracterización y Cuantificación de las Poblaciones Microbianas

#### 6.1.1. Cuantificación Indirecta Mediante Actividades Enzimáticas

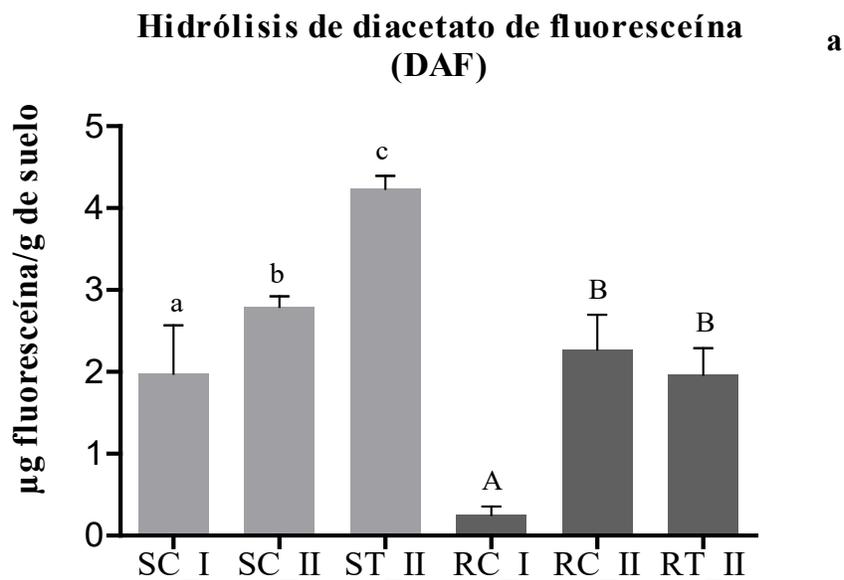
Dada la complejidad estructural de las comunidades microbianas del suelo, sus poblaciones se pueden medir a través de métodos indirectos basados en la actividad de los microorganismos, como la respiración edáfica y la producción de enzimas (Ortíz-Maya *et al.*, 2017). La mayor parte de estas enzimas son producto del metabolismo o lisis celular, por lo que la cuantificación de sus actividades se considera uno de los métodos para medir de manera indirecta el total de microorganismos presentes en el suelo. Además, la actividad enzimática de la microbiota del suelo, permite correlacionar la proporción de los microorganismos metabólicamente activos y su biomasa, como uno de los indicadores biológicos que más se utilizan para evaluar la calidad y la fertilidad del suelo, el impacto de diferentes tratamientos y prácticas agrícolas (Hanson *et al.*, 2012; Morrison-Whittle *et al.*, 2017).

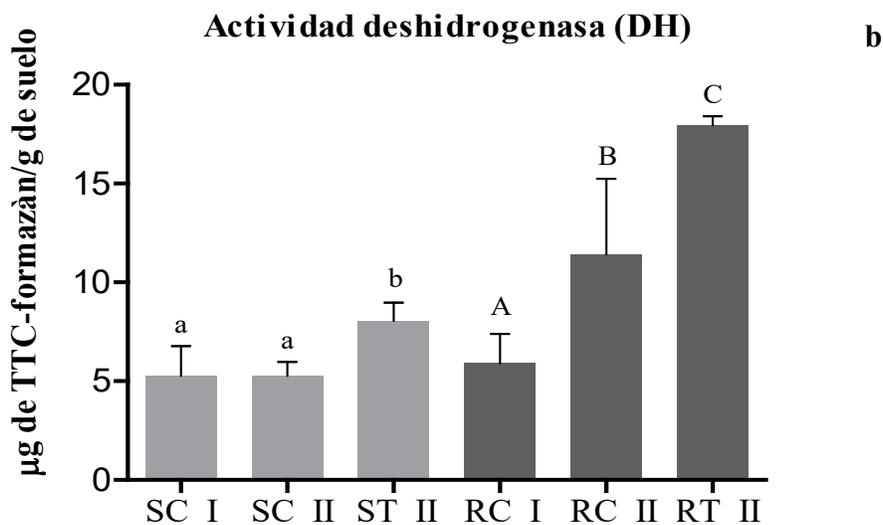
En el presente estudio, se determinó la actividad enzimática de la microbiota presente en suelo rizosférico y no rizosférico del cultivo de vid, *Vitis vinifera* var Flame. Como los factores abióticos (temperatura, humedad) y la etapa fenológica del cultivo pueden ejercer efecto sobre la composición de las comunidades microbianas y por ende en sus actividades enzimáticas (Bowles *et al.*, 2014), se realizó la toma de muestras en dos etapas fenológicas distintas. Los resultados se presentan en la Fig. 3. (Inicios de la brotación y en poscosecha).

6.1.1.1 Hidrólisis de DAF en suelo no rizosférico y rizosférico. En el suelo no rizosférico, la medición de la actividad enzimática tuvo un valor promedio de  $1.979 \pm 0.59$   $\mu\text{g}$  de fluoresceína/g en la brotación del cultivo (sin aplicación de los bioestimulantes). Durante la etapa de poscosecha se registraron concentraciones de fluoresceína de  $2.793 \pm 0.132$   $\mu\text{g/g}$  en el suelo control y 4.237

$\mu\text{g/g}$  en el suelo tratado. Las muestras tomadas a inicios del experimento, no fueron tratadas con los bioestimulantes, por lo que tomamos estos valores y los de poscosecha control, para evaluar los posibles cambios inducidos sobre la actividad de las enzimas por la etapa fenológica de la planta. En ese sentido, se observó un incremento de un 41% de la concentración de fluoresceína hacia la etapa de poscosecha. De igual modo, el tratamiento aplicado, tuvo efecto ( $p=0.0002$ ) en el suelo no rizosférico, donde la concentración de fluoresceína aumentó un 52% en el suelo tratado respecto al control (Fig. 3a).

En el suelo rizosférico, durante la brotación se obtuvo un valor de  $0.254\pm 0.102 \mu\text{g}$  fluoresceína/g, mientras que en la poscosecha las concentraciones fueron de  $2.271\pm 0.426 \mu\text{g}$  de fluoresceína/g y  $1.965\pm 0.324 \mu\text{g}$  de fluoresceína/g en el suelo rizosférico control y tratado, respectivamente. En este compartimiento, la concentración de fluoresceína se vio incrementada ( $p<0.05$ ) en un 700% aproximadamente, lo que refleja los efectos de la etapa de desarrollo de la vid sobre las enzimas en el suelo rizosférico. En cuanto al tratamiento aplicado, en este caso no se observaron diferencias ( $p>0.05$ ) entre las actividades enzimáticas en suelos rizosférico control y tratado en la etapa de poscosecha (Fig. 3a).





**Figura 3.** Actividad enzimática: (a) Hidrólisis de diacetato de fluoresceína (DAF) y (b) Actividad deshidrogenasa (DH) en suelo no rizosférico y rizosférico. S: suelo no rizosférico, R: suelo rizosférico, C: control, T: tratado, I: Brotación, II: poscosecha. Letras diferentes: indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

6.1.1.2. Actividad deshidrogenasa (DH) en suelo no rizosférico y rizosférico. La actividad DH en el suelo no rizosférico durante la brotación mostró un valor promedio de  $5.275 \pm 1.503$  µg de TTC-formazán/g suelo. En la poscosecha, se obtuvieron concentraciones de  $5.267 \pm 0.711$  µg de TTC-formazán/g en el suelo control y  $8.057 \pm 0.913$  µg de TTC-formazán/g en el suelo tratado. En este mismo compartimiento, el estado de desarrollo de la planta, no influyó ( $p > 0.05$ ) en la actividad enzimática, sin embargo, con la aplicación del tratamiento la concentración de formazán en las muestras de suelo tratadas incrementó un 52% ( $p = 0.026$ ) respecto al suelo no rizosférico control. En el suelo rizosférico, la actividad DH tuvo un valor de  $5.903 \pm 1.495$  µg de TTC-formazán/g en la etapa de brotación, mientras que, en la poscosecha se registraron concentraciones de  $11.427 \pm 3.817$  µg de TTC-formazán/g en el suelo rizosférico control y  $17.957 \pm 0.459$  µg de TTC-formazán/g en el suelo rizosférico tratado (Fig.3b). Al comparar las actividades enzimáticas en las muestras control de la brotación y poscosecha en este compartimiento, se observó un aumento de la concentración de formazán en un 93% ( $p < 0.05$ ) hacia la segunda etapa estudiada, lo que refleja el efecto positivo de la etapa fenológica de la planta sobre las enzimas que llevan a cabo este proceso de oxidación en el suelo de la rizosfera. De igual manera, el tratamiento aumentó en un

57% la concentración de TTC-formazán en el suelo rizosférico tratado respecto al suelo rizosférico control.

Las técnicas de hidrólisis de DAF y actividad DH fueron empleadas para evaluar el efecto de factores bióticos y abióticos sobre la actividad de las enzimas del suelo. Excepto la actividad DH medida en el suelo no rizosférico ( $5.275 \pm 1.503 \mu\text{g}$  de TTC-formazán/g de suelo en brotación y  $5.267 \pm 0.711 \mu\text{g}$  de TTC-formazán/g de suelo en poscosecha), las actividades enzimáticas medidas por ambos métodos, fueron mayores hacia la etapa de poscosecha, tanto en suelo no rizosférico como en el suelo rizosférico. Las muestras de suelo circundante o no rizosférico, en este tipo de experimentos se toman como muestras control, donde los factores bióticos generalmente no inducen cambios. Sin embargo, las vides como cultivos perennes tienen un sistema radicular muy desarrollado, el tiempo de plantación (8 años) da lugar a raíces muy largas, además la forma en la que fueron tomadas estas muestras, indica que el suelo denominado no rizosférico, se encuentra bajo la influencia de las raíces, pero en menor medida. Los cambios morfológicos de la raíz y la liberación de compuestos orgánicos a la rizósfera, están relacionados con la edad o el desarrollo de la planta, lo que puede modificar la microbiota edáfica y aumentar la actividad microbiana en estos suelos (Edwards *et al.*, 2015; Mganga *et al.*, 2019). También hay otros factores involucrados en la actividad y estabilidad de las enzimas del suelo, como el pH, el contenido de humedad del suelo, la vegetación, el contenido de materia orgánica, la concentración  $\text{Fe}^{2+}$  y la densidad aparente que en sus condiciones óptimas pueden aumentar la actividad de las enzimas involucradas en los procesos de hidrólisis y oxidación biológica de compuestos orgánicos en el suelo (Ramos y Zúñiga, 2008; Kumar *et al.*, 2010). Es cierto que las plantas y otros organismos en el suelo pueden liberar enzimas al medio, sin embargo, su mayor producción se les atribuye a los microorganismos por su gran biomasa, su alta actividad metabólica y su corto ciclo de vida (Cerón y Melgarejo, 2005).

En el caso de la medición con DAF, se observó un incremento significativo de la actividad en el suelo no tratado como consecuencia de la etapa fenológica del cultivo; sin embargo, en el caso de la medición de la actividad DH, no se observaron tales efectos. La actividad de las enzimas puede aumentar con la aplicación de enmiendas orgánicas (materiales carbonados de origen animal o vegetal), pero también se ve afectada en algunos suelos cuando la concentración de algunos compuestos tóxicos o metales pesados es muy alta. La relación C/N es importante en el suelo, pues cuando es baja ( $<20$ ) se aceleran los procesos de mineralización del N, lo que provoca que aumente la concentración de  $\text{NO}_3^-$  que puede actuar como aceptor de electrones e inhibir la actividad DH

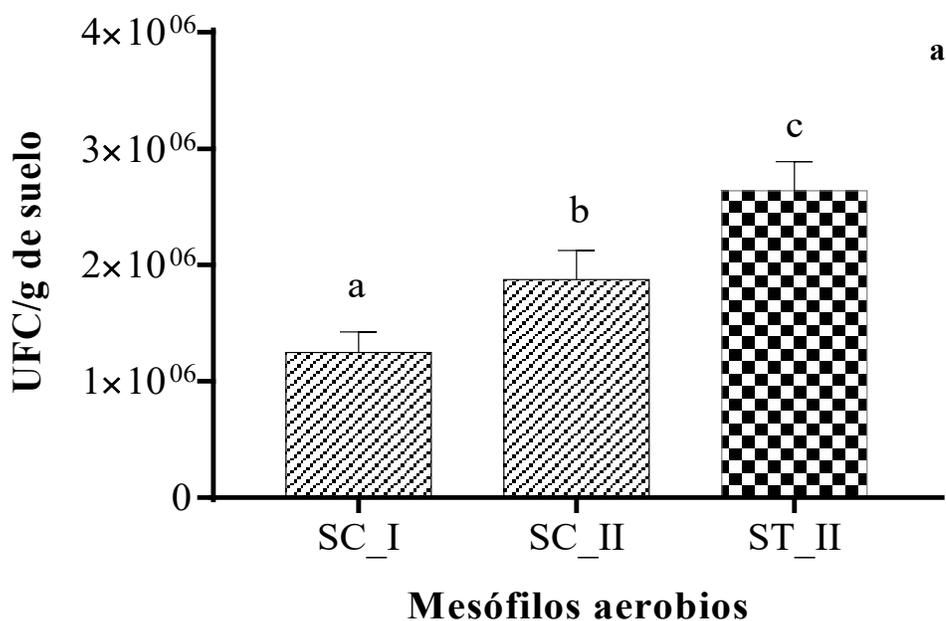
(Casida *et al.*, 1964). Además, la acumulación de compuestos xenobióticos como productos químicos para controlar plagas, malezas o enfermedades en las plantas, pueden afectar negativamente la actividad de estas enzimas (Acosta y Paolini, 2005).

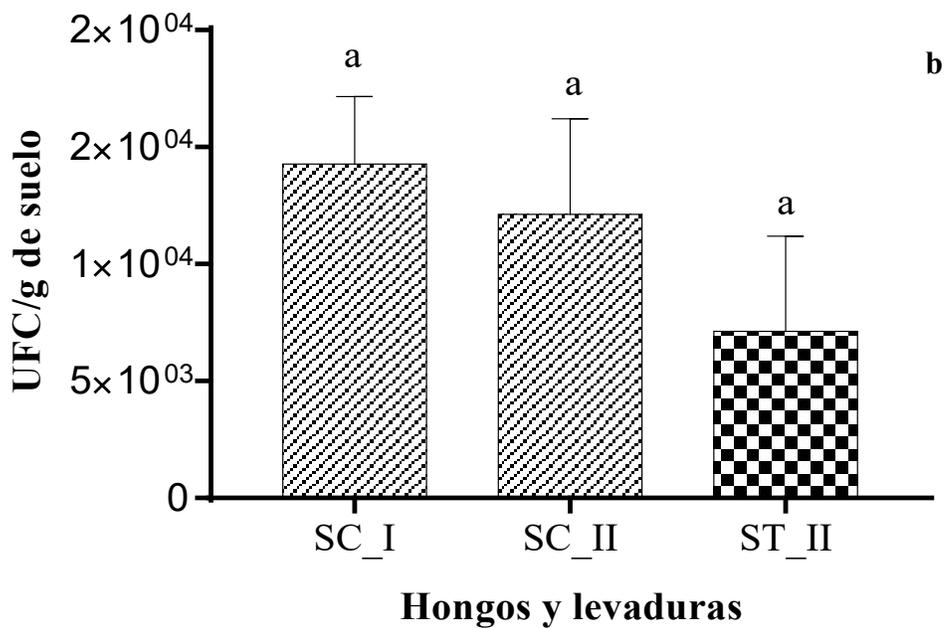
La aplicación de los tratamientos (ExuRoot y Nutrisorb) también aumentó la actividad enzimática en el suelo no rizosférico y rizosférico. La aplicación de estos productos aumenta la absorción activa de nutrientes a través de los pelos absorbentes y estimula el crecimiento de raíces secundarias, así como la liberación de exudados a través de las raíces de estas plantas, lo que puede favorecer la colonización de estas estructuras por microorganismos y una mayor actividad microbiana en estos hábitats. Además, de los tratamientos evaluados en este experimento, el cultivo de uva de mesa es sometido a intensas aplicaciones de pesticidas, herbicidas, nematicidas, fungicidas y sales minerales según las necesidades nutricionales de los suelos de viñedos, lo que puede alterar los procesos bioquímicos en el suelo, la estructura y la nutrición de la planta y reducir la actividad de hidrolasas (lipasas, proteasas y esterases) (Adam y Duncan, 2001; Kumar *et al.*, 2010; Radic *et al.*, 2014) o interferir en los métodos enzimáticos como se observa en la medición de hidrólisis de DAF hacia la poscosecha en el suelo rizosférico tratado.

La efectividad al aplicar bioestimulantes se ha comprobado con el aumento de la biomasa microbiana en el suelo y, por ende, la actividad enzimática; lo que incrementa a su vez, la descomposición de la materia orgánica derivada de residuos vegetales (Tejada *et al.*, 2011; Hellequin *et al.*, 2018). De manera similar a los resultados del presente trabajo, se han descrito cambios significativos en la estructura y actividad microbiana en suelos cultivados con tomate, bajo el efecto de fertilizantes a base de extractos de algas marinas (Wang *et al.*, 2018). De igual manera, se han observado incrementos en las reacciones de oxidación-reducción llevadas a cabo por deshidrogenasas en campos cultivados con *Vitis vinifera*, sometidos a un sistema de manejo integrado (inoculante microbiano y aplicaciones prolongadas de fertilizantes a base de N, P y K (Fincheira-Robles *et al.*, 2018). El aumento de la actividad enzimática se relaciona con la biomasa microbiana presente en estos suelos agrícolas, donde se procura mantener estable la microbiota edáfica por sus beneficios y funciones en la descomposición de la materia orgánica y los ciclos de nutrientes (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2018), actuando, además, como un indicador de la calidad y fertilidad de los suelos y reflejar el buen estado que poseen los suelos de un viñedo.

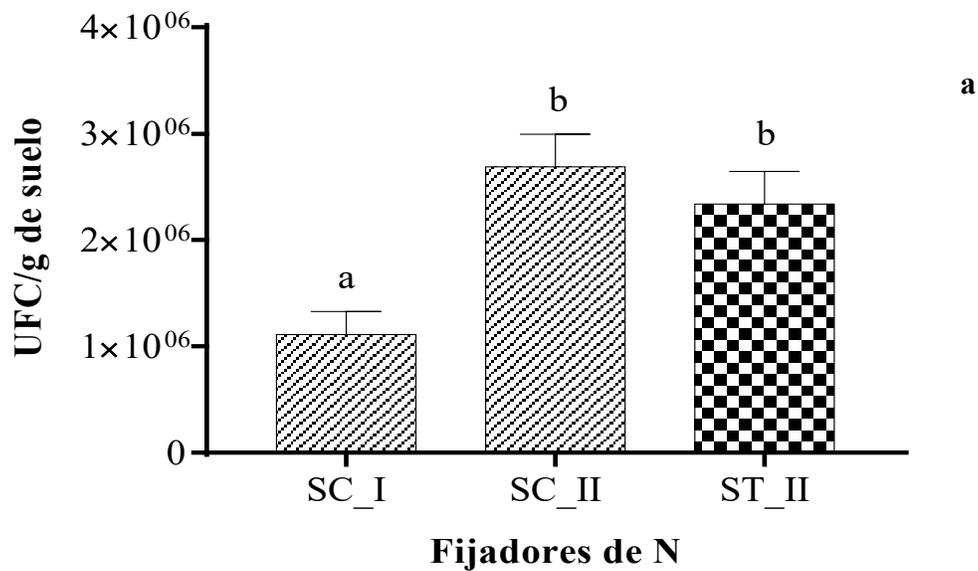
## 6.2. Cuantificación de Principales Grupos de Microorganismos y Nemátodos Mediante Técnicas Convencionales.

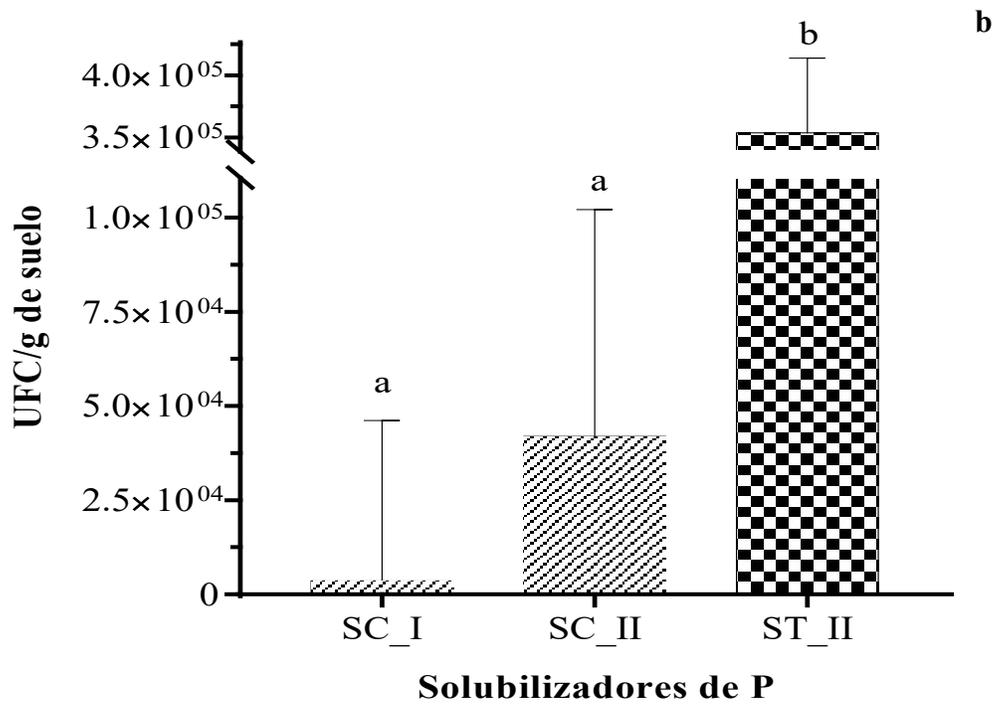
La evaluación de las UFC en el cultivo en placas y la determinación de la actividad enzimática anteriormente analizada, como métodos convencionales, tienen la ventaja de proporcionar información de los microorganismos activos reales (Braun *et al.*, 2006) que pueden estar involucrados en procesos de reciclaje de nutrientes y recuperación del ecosistema a través de sus actividades metabólicas en el momento del muestreo (Vale *et al.*, 2005; Fuentes-Ramírez *et al.*, 2018).



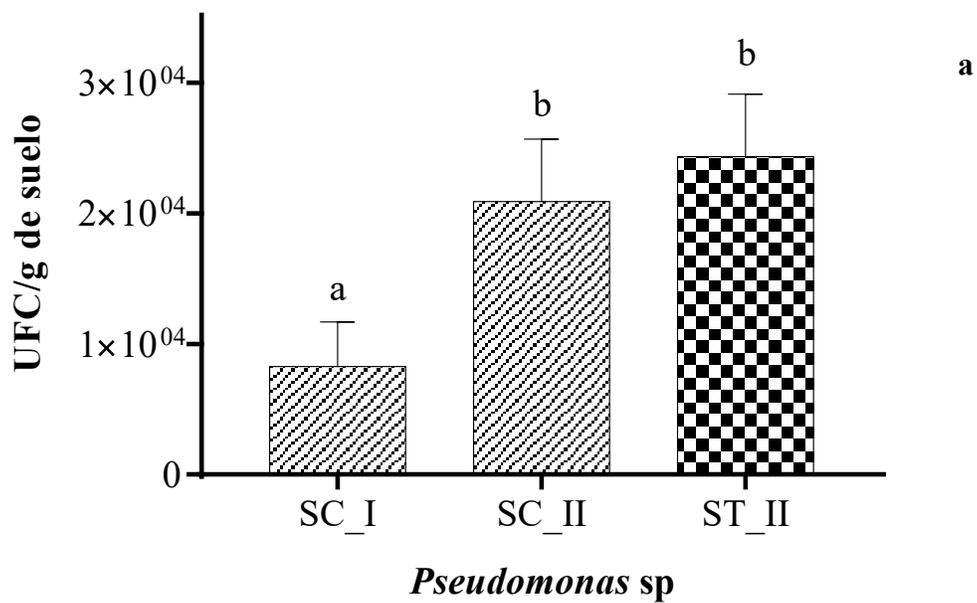


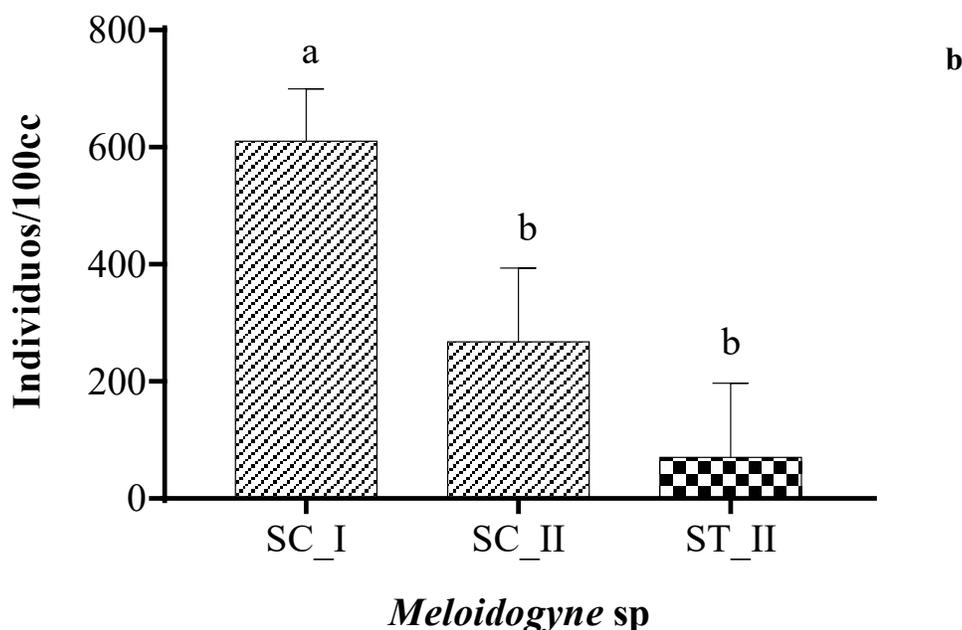
**Figura 4.** Conteo de UFC/g de suelo de a) Mesófilos aerobios y (b) hongos y levaduras. SC: suelo no rizosférico control, ST: suelo no rizosférico tratado. I: Brotación, II: poscosecha. Letras diferentes: hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).





**Figura 5.** Conteo de UFC/g de suelo de (a) fijadores de N y b) solubilizadores de P. SC: suelo no rizosférico control, ST: suelo no rizosférico tratado. I: Brotación, II: poscosecha. Letras diferentes: hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).





**Figura 6.** Conteo de (a) *Pseudomonas* sp (UFC/g de suelo y b) *Meloidogyne* sp (Individuos/100cc. SC: suelo no rizosférico control, ST: suelo no rizosférico tratado. I: Brotación, II: poscosecha. Letras diferentes: hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por ello, otra de las estrategias seguidas para caracterizar la microbiota presente en suelo cultivado con vid, fue la determinación de los principales grupos microbianos cultivables, a través de técnicas tradicionales y medios de cultivo específicos. Los grupos cuantificados fueron: mesófilos aerobios (Fig. 4a), hongos y levaduras (Fig. 4b), fijadores de N (Fig. 5a), solubilizadores de P (Fig. 5b) y *Pseudomonas* sp (Fig. 6a). Asimismo, se realizó una cuantificación de nemátodos fitopatógenos al ser uno de los principales problemas sanitarios del cultivo (Fig. 6b).

Durante la brotación de la vid se obtuvieron recuentos de mesófilos aerobios ( $1.25 \times 10^6$  UFC/g de suelo) y hongos y levaduras ( $14.7 \times 10^3$  UFC/g de suelo) (Fig.4a y b). Fijadores de nitrógeno ( $1.11 \times 10^6$  UFC/g de suelo) y solubilizadores de P ( $3.6 \times 10^3$  UFC/g de suelo) (Fig.5a y b), *Pseudomonas* sp ( $8.3 \times 10^3$  UFC/g de suelo) y *Meloidogyne* sp ( $6.1 \times 10^2$  individuos/100cc de suelo) (Fig.6a y b).

En la etapa de poscosecha se registraron conteos de mesófilos aerobios ( $1.9 \times 10^6$  UFC/g de suelo control y  $2.63 \times 10^6$  UFC/g de suelo tratado), hongos y levaduras ( $12.1 \times 10^3$  UFC/g de suelo control y  $7.1 \times 10^3$  UFC/g de suelo tratado). Las poblaciones de fijadores de nitrógeno tuvieron conteos de

$2.7 \times 10^6$  UFC/g y  $2.3 \times 10^6$  UFC/g de suelo control y tratado respectivamente. Mientras que los solubilizadores de P tuvieron conteos de  $41.8 \times 10^3$  UFC/g de suelo control y  $353.7 \times 10^3$  UFC/g de suelo tratado. También se obtuvieron conteos de los géneros *Pseudomonas* ( $20.8 \times 10^3$  UFC/g de suelo control y  $24.3 \times 10^3$  UFC/g de suelo tratado) y *Meloidogyne* ( $2.67 \times 10^2$  y  $0.71 \times 10^2$  individuos/100cc de suelo control y tratado, respectivamente).

Las poblaciones de mesófilos aerobios mostraron un aumento ( $p=0.0002$ ) del 50% hacia la etapa de poscosecha en las muestras sin tratamiento, por efecto de los cambios en las etapas fenológicas del cultivo. Del mismo modo, se observaron diferencias ocasionadas por el tratamiento hacia la etapa de poscosecha, donde las poblaciones presentes en suelo no rizosférico tratado superaron en un 40% ( $p=0.0002$ ) la cantidad de representantes de este grupo funcional en el suelo control. Entre los mesófilos aerobios se encuentran un amplio número de bacterias y hongos incluyendo agentes patógenos y benéficos, que tienen la capacidad de vivir a temperaturas óptimas entre 25-37°C, además de requerir oxígeno para su proliferación (Madigan *et al.*, 2012). Sin embargo, la cantidad de hongos presentes en el suelo no rizosférico no varió ( $p>0.05$ ) con ninguno de los factores evaluados en este estudio (etapa fenológica y aplicación de bioestimulantes), lo que sugiere, que hay un mayor crecimiento de especies bacterianas cultivables que de hongos en el suelo. Este último grupo microbiano puede crecer en la capa superficial del suelo, donde las condiciones y la disponibilidad de recursos nutricionales favorece su desarrollo, no obstante, la compactación de los suelos, el exceso de uso de productos químicos (Pacasa-Quisbert *et al.*, 2017) (fungicidas) y los períodos de sequía puede reducir el crecimiento de las comunidades fúngicas. Este comportamiento puede ocurrir por las diferencias en el metabolismo de ambos grupos microbianos, que en ocasiones favorece el desarrollo de bacterias mucho más rápido que el de hongos, en suelos con poca humedad como el suelo del viñedo en estudio.

El efecto del desarrollo de la planta se observó sobre las poblaciones de fijadores de N, con aumento ( $p=0.0002$ ) de las UFC/g de suelo hacia la poscosecha en un 142%. En este grupo microbiano que abunda en el suelo no rizosférico, es de suponer que se encuentran algunas especies fúngicas que forman micorrizas y contribuyen al transporte de N a través de las raíces de las plantas. Pero también hay géneros bacterianos como como *Burkholderia*, *Azotobacter* y *Azospirillum* que, a su vez, pueden crecer en el rango de temperatura en el que se desarrollan los mesófilos aerobios, por lo que también podemos relacionar el aumento de mesófilos y fijadores de N por efecto de la etapa fenológica de la vid.

En el caso de *Burkholderia*, ha sido ampliamente estudiada específicamente la cepa endofítica *B. phytofirmans* PsJN aislada de suelos de viñedos y probada en campo por su potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) (Andreolli *et al.*, 2019). Otros géneros como *Azospirillum* y *Azotobacter*, son bacterias Gram negativas que habitan a menudo la rizosfera de una gran variedad de plantas, e incluso en diferentes regiones climáticas. Además de su participación en el ciclo del N, también producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), sideróforos (agentes quelantes de hierro) y bacteriocinas. El aumento de este grupo funcional en el suelo no rizosférico de vid resulta de gran interés pues se ha visto su efecto, tanto en cultivos anuales, como perennes, en el aumento de intercambio iónico y la mejora de la estructura del suelo. También disminuyen la incidencia de plagas y enfermedades en plantas y pueden ayudar a disminuir la frecuencia de aplicación de pesticidas, ya que la planta tiene los nutrientes necesarios en las etapas de desarrollo, no se compromete la productividad del cultivo (Tapia *et al.*, 1990; Santana-Aragones *et al.*, 2017)

Las poblaciones de solubilizadores de P aumentaron ( $p=0.0001$ ) en un 744% en el suelo no rizosférico tratado hacia la etapa de poscosecha, lo que sugiere que el tratamiento con bioestimulantes benefició el establecimiento de esta población de microorganismos. En el anexo 2 se resumen los nutrientes que son aplicados a las vides por cada etapa de desarrollo, incluyendo fuentes de fósforo, sin embargo, el enriquecimiento de estas poblaciones sugiere que las cantidades no son suficientes por lo que la planta hospedera desarrolla sus mecanismos para atraer bacterias y hongos que cumplan estas funciones, incluyendo la liberación de hormonas vegetales como las estrigolactonas, que promueven el crecimiento y el metabolismo de microorganismos que contribuyen a la captación de P (Breuillin *et al.*, 2010). Hay muchas especies bacterianas relacionadas con la liberación de ácidos orgánicos a la rizosfera para solubilizar las formas de P presentes en el suelo y que sean asimilados por las plantas. Entre ellas, se encuentran las pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, que pueden sobrevivir incluso bajo concentraciones pobres de nutrientes (Martins *et al.*, 2013), como las que presentan los suelos franco-arenosos. La diversidad funcional y la cantidad de UFC de estos grupos microbianos se ha evaluado mediante técnicas tradicionales de conteo en placa en suelos de banano bajo distintos regímenes de cultivo (orgánico y convencional), demostrando la prevalencia de estos grupos bacterianos en los suelos bajo un sistema de manejo orgánico (Yu-Meng *et al.*, 2017). El aumento significativo de estos microorganismos, una vez más se puede explicar por el efecto que podrían

tener los bioestimulantes sobre la microbiota edáfica presente en estos viñedos. La formación de raíces secundarias y pelos absorbentes, y la liberación de exudados al suelo puede resultar atractivo para estos grupos de microorganismos benéficos.

Anteriormente se discutió la posibilidad de que aumenten tanto especies fúngicas como bacterianas que solubilizan P, como es el caso de *Pseudomonas* sp. Sin embargo, este género mostró un aumento del 152% ( $p=0.0173$ ) en el suelo no rizosférico control hacia la etapa de poscosecha. Análisis que sólo refleja el efecto significativo del desarrollo de la planta sobre estos microorganismos. Su capacidad de producir sideróforos, ácido indol acético (AIA), inducir resistencia sistémica y producir enzimas hidrolíticas, la incluye en el grupo de PGPR y se utilizan como estrategias de control de fitopatógenos en plantas herbáceas y leñosas (Wu *et al.*, 2016). Este último rasgo mencionado (producción de enzimas hidrolíticas) se puede relacionar con el aumento observado en la actividad enzimática: hidrólisis de DAF dirigido fundamentalmente por el desarrollo de la planta en el suelo no rizosférico. Su acción inhibitoria ha sido reportada por Andreolli *et al.*, (2019) sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y el desarrollo del micelio fúngico de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium verticilloide* y otras especies fúngicas que se relacionan con enfermedades de la vid.

En algunas ocasiones, la aplicación de fertilizantes químicos ha impactado negativamente sobre las poblaciones de bacterias diazótroficas y los niveles de C y P en suelos semiáridos cultivado con sorgo (Hai *et al.*, 2009; Cerón y Aristizábal, 2012). Se ha señalado el impacto de las fertilizaciones y las etapas fenológicas de este cultivo en el comportamiento de los grupos funcionales presentes en el suelo (Hai *et al.*, 2009; Cerón y Aristizábal, 2012). Contrariamente, los resultados del presente estudio muestran que la fertilización con N, K, P no tuvo un efecto negativo sobre las poblaciones de bacterias diazótroficas, mientras que la aplicación de los bioestimulantes y la etapa fenológica del cultivo, favorecieron el crecimiento de estos grupos funcionales, importantes para el desarrollo vegetal.

La mayor cantidad de nemátodos presentes en suelo no rizosférico pertenecen al género *Meloidogyne*. Estas poblaciones mostraron una reducción significativa en el suelo no rizosférico control (55%,  $p=0.003$ ) hacia la etapa de poscosecha. En esta última etapa fenológica, también se observó una reducción del 73% en el suelo no rizosférico tratado, sin embargo, por los altos valores de desviación estándar ( $267\pm 73$  en el suelo no rizosférico control y  $71\pm 65$  Individuos/100 cc en el suelo tratado) no se observó el efecto significativo del tratamiento. Este comportamiento también

resulta de gran interés, puesto que *Meloidogyne* sp es una de las especies de plagas más comunes y que causa grandes pérdidas en la agricultura (Wilschut *et al.*, 2019). En suelos cultivados con vid se han aislado diferentes especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, de las que se ha comprobado su efectividad en el control de *Meloidogyne javanica* (Condemarín *et al.*, 2018). Lo que sugiere que el aumento de grupos microbianos benéficos en el suelo del viñedo en estudio y la aplicación regular de nematicidas (Fenamifos, Nemacur, Nematrol, Anexo 2) a lo largo de todo el ciclo del cultivo de vid, también puede estar relacionado con la reducción de estos nematodos fitopatógenos. Los cambios en las poblaciones microbianas que se observan en este estudio corroboran lo descrito en la literatura sobre la influencia de la edad de la planta en la microbiota rizosférica (Mganga *et al.*, 2019). En el caso de la vid, se ha demostrado como a lo largo de su ciclo de crecimiento y de reproducción cambian los exudados de las raíces y los materiales orgánicos del suelo (Hernández y Menéndez, 2019). El aumento en algunas de las poblaciones microbianas estudiados en este apartado, tiene gran significado sobre todo para los suelos agrícolas por sus beneficios en la toma de nutrientes, a partir de la solubilización de fuentes de fósforo en el suelo, la fijación de N, así como la producción de hormonas involucradas en la promoción del crecimiento vegetal.

### 6.3. Cuantificación Absoluta de Poblaciones Bacterianas y Fúngicas Asociadas al Cultivo de la Vid.

A través de PCR en tiempo real (qPCR) se determinó la concentración absoluta de las poblaciones bacterianas y fúngicas presentes en suelo no rizosférico, suelo rizosférico y rizoplano de la vid en las dos etapas fenológicas (inicio de la brotación y poscosecha). Los resultados se presentan en la Fig. 7 y 8.

La concentración bacteriana se determinó a partir del número de copias del gen ribosomal 16S con una eficacia de reacción de 0.749 ( $R^2= 0.997$ ). En el suelo no rizosférico (S) durante la brotación el valor promedio de concentración bacteriana fue de  $8.09 \times 10^7 (\pm 1.98 \times 10^7)$ . En la poscosecha las concentraciones fueron de  $5.39 \times 10^6 (\pm 9.01 \times 10^6)$  en el suelo no rizosférico control y  $1.58 \times 10^7 (\pm 0.88 \times 10^6)$  en el suelo tratado. En el suelo rizosférico (R) la concentración bacteriana en la brotación fue de  $6.19 \times 10^7 (\pm 1.72 \times 10^7)$ . Hacia la poscosecha la concentración bacteriana se

incrementó de  $7.48 \times 10^6 (\pm 9.31 \times 10^6)$  en el suelo rizosférico control a  $2.66 \times 10^7 (\pm 1.59 \times 10^7)$  en el suelo rizosférico tratado. Por su parte, en el rizoplano (Rp) la cantidad absoluta de bacterias en brotación fue  $1.51 \times 10^8 (\pm 6.44 \times 10^7)$  y en poscosecha fue de  $1.22 \times 10^8 (\pm 7.03 \times 10^7)$  y  $1.72 \times 10^8 (\pm 8.79 \times 10^7)$  en el rizoplano control y tratado, respectivamente (Fig.7)

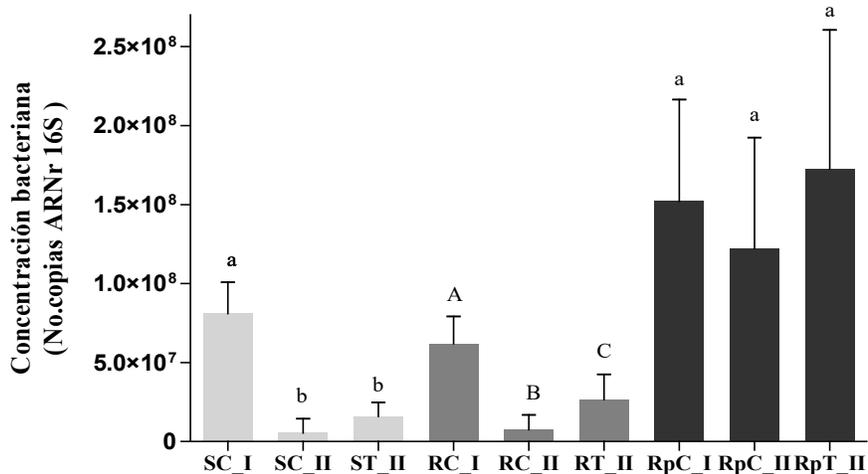
La cantidad absoluta de hongos se determinó a partir del número de copias del gen ribosomal 18S con una eficiencia de reacción de 0.844 ( $R^2 = 0.9964$ ). En el suelo no rizosférico (S) durante la brotación, el valor promedio de concentración fúngica fue de  $4.05 \times 10^5 (\pm 3.89 \times 10^5)$ . En la poscosecha las concentraciones fueron de  $5.08 \times 10^5 (\pm 1.06 \times 10^5)$  en el suelo control y  $3.50 \times 10^5 (\pm 3.01 \times 10^4)$  en el suelo tratado. En el suelo rizosférico (R), la concentración fúngica durante la brotación fue de  $4.05 \times 10^5 (\pm 1.73 \times 10^5)$ . Hacia la poscosecha estas cantidades variaron de  $1.57 \times 10^6 (\pm 5.60 \times 10^5)$  en el suelo rizosférico control a  $3.28 \times 10^6 (\pm 1.27 \times 10^6)$  en el suelo rizosférico tratado. En el rizoplano (Rp) la cantidad absoluta de hongos en brotación fue  $1.47 \times 10^6 (\pm 7.43 \times 10^5)$  sin tratamiento; mientras que en la poscosecha fue de  $1.27 \times 10^6 (\pm 4.53 \times 10^5)$  y  $1.58 \times 10^6 (\pm 5.55 \times 10^6)$  en el rizoplano control y tratado, respectivamente (Fig.8).

La concentración bacteriana en el suelo no rizosférico (S) control fue mayor (15 veces,  $p < 0.05$ ) durante la etapa de brotación del cultivo respecto a la poscosecha. En la poscosecha, además de observar una menor población bacteriana, no se encontraron diferencias entre el suelo no rizosférico control y tratado. En el suelo rizosférico (R) también se observó la mayor cantidad de bacterias (8 veces,  $p < 0.05$ ) en la etapa de brotación del cultivo. Hacia la poscosecha, el número de bacterias presentes en el suelo tratado superó 3.5 veces ( $p < 0.05$ ) a las presentes en el suelo rizosférico control. Mientras que, en el rizoplano (Rp) se encontró la mayor cantidad de bacterias en un orden de  $10^8$ , sin diferencias significativas de acuerdo a la etapa fenológica o la aplicación de los bioestimulantes (Fig. 7).

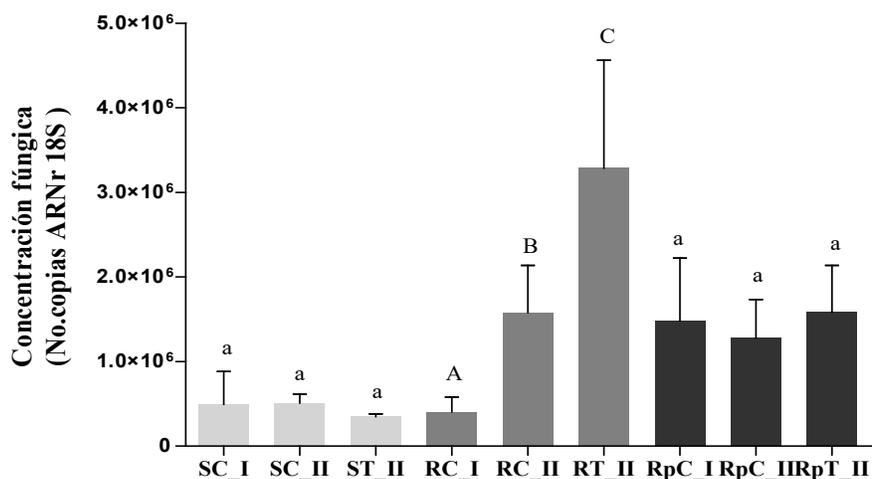
Las poblaciones fúngicas presentes en todos los compartimientos estudiados fueron menores a las poblaciones bacterianas (Fig. 9). Nuestros resultados mostraron que el estado fenológico de la planta y el tratamiento no afectó la población de hongos en el suelo no rizosférico y en el rizoplano; mientras que, sí se observó un efecto significativo del desarrollo de la planta en la concentración de hongos en el suelo rizosférico, donde se hubo un incremento de 4 veces ( $p < 0.05$ ) hacia la etapa de poscosecha. Así mismo, el tratamiento aplicado incrementó significativamente las poblaciones de hongos en el suelo rizosférico (en al menos 2 veces,  $p < 0.05$ ) (Fig. 8).

Tanto las bacterias, como los hongos presentaron una mayor concentración a medida que crecen en hábitats más cercanos a la superficie de la raíz. Esto sugiere que la microbiota presente en el rizoplasma presenta cierto grado de especialización y características que le permiten estar en contacto con las células epidérmicas de la raíz, además de contribuir a la toma de nutrientes y a la vez beneficiarse de moléculas orgánicas que exudan estas raíces. En este nicho, la mayor disponibilidad de nutrientes puede reducir la competencia entre estos agentes biológicos y, por tanto, que su población sea mayor y no se afecte por el estado fenológico de la planta o el tratamiento. Las plantas pueden liberar hasta el 40% de sus fotosintatos en la rizosfera, por lo que la densidad bacteriana en este nicho varía típicamente entre  $10^8$  y  $10^9$ /g, y es mayor que en el seno del suelo (Berendsen *et al.*, 2012). A pesar de que se obtuvieron concentraciones bacterianas ligeramente menores a las reportadas ( $10^7$  y  $10^8$ /g de suelo), la densidad microbiana en el suelo rizosférico fue mayor que en el suelo no rizosférico.

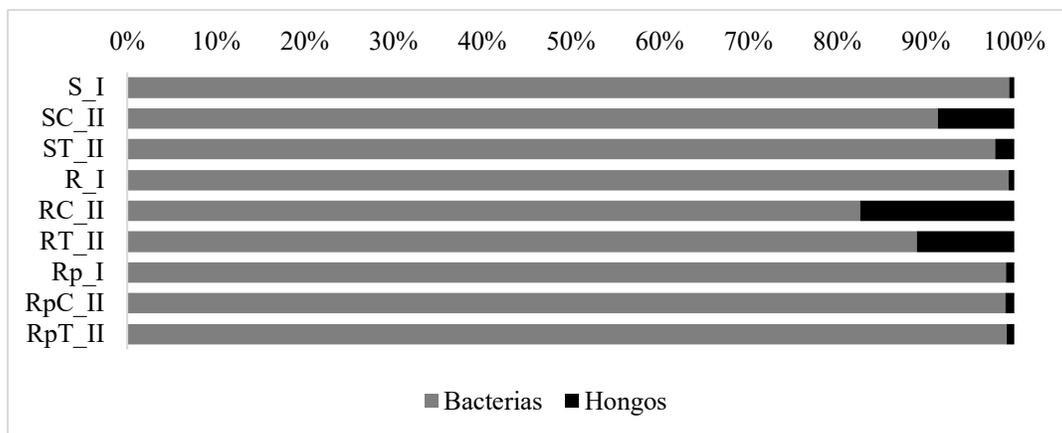
Otras observaciones fueron hechas en cuanto a la relación bacterias: hongos durante la poscosecha del cultivo. Esto con el objetivo de ver el incremento de estas poblaciones microbianas en cuanto al tratamiento aplicado en el estudio. Durante la poscosecha, la cantidad de bacterias fue mayor que la de hongos en todos los compartimientos estudiados. La relación bacteria: hongo fue de (10:1) en el suelo no rizosférico control y (45:1) después del tratamiento. En el suelo rizosférico fue de (4:1) en el control y (8:1) en el suelo rizosférico tratado, mientras que en el rizoplasma fue de (95:1) sin tratamiento y (109:1) con la aplicación de los bioestimulantes, lo que sugiere que el tratamiento aplicado afecta positivamente el crecimiento de las poblaciones bacterianas más que la de los hongos. En general, las bacterias representan el mayor número, mientras que los hongos ocupan el mayor porcentaje de la biomasa microbiana presente en el suelo (Pacasa-Quisbert *et al.*, 2017). Además, los ecosistemas basados en bacterias se caracterizan por tener alta disponibilidad de nutrientes y bajas cantidades de materia orgánica rica en nutrientes, lo que resulta en una actividad biológica elevada. No obstante, esta relación no significa que las poblaciones bacterianas sean más importantes que las fúngicas, ya que ambos grupos microbianos viven en constante interacción, incluso los hongos descomponen algunos compuestos recalcitrantes antes de ser asimilados por las bacterias en cualquier ecosistema (Wang *et al.*, 2019b).



**Figura 7.** Cantidad absoluta (número de copias del gen ribosomal 16S) de bacterias. S: Suelo no rizosférico, R: suelo rizosférico y Rp: rizoplano. C: control y T: tratado I: Brotación, II: poscosecha. Letras minúsculas y mayúsculas se utilizan para diferenciar el análisis estadístico realizado en cada compartimiento. Letras diferentes: hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) mediante prueba de comparación de medias de LSD Fisher



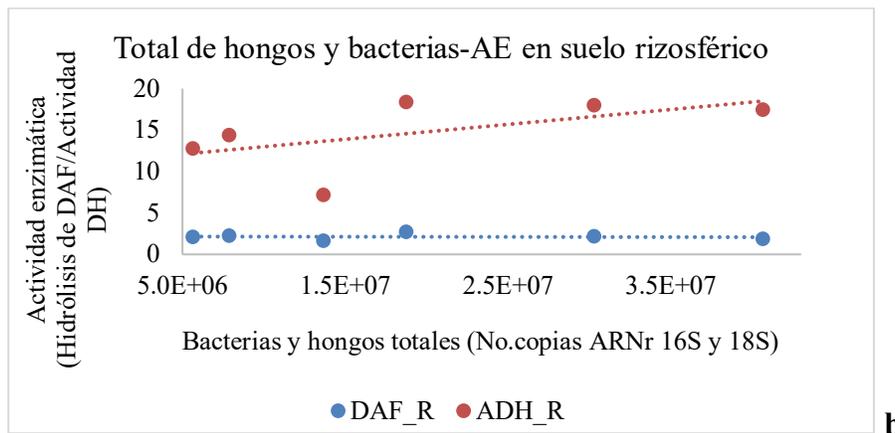
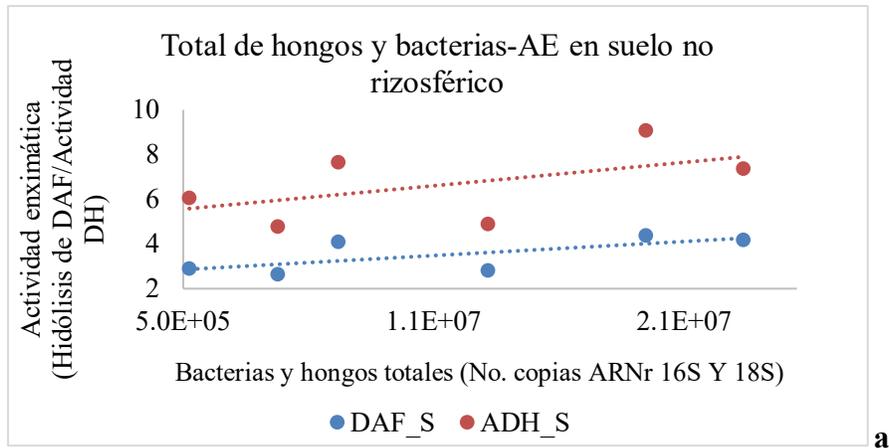
**Figura 8.** Cantidad absoluta (número de copias del gen ribosomal 18S) de hongos. S: Suelo no rizosférico, R: suelo rizosférico y Rp: rizoplano. C: control y T: tratado I: Brotación, II: poscosecha. Letras minúsculas y mayúsculas se utilizan para diferenciar el análisis estadístico realizado en cada compartimiento. Letras diferentes: hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) mediante prueba de comparación de medias de LSD Fisher



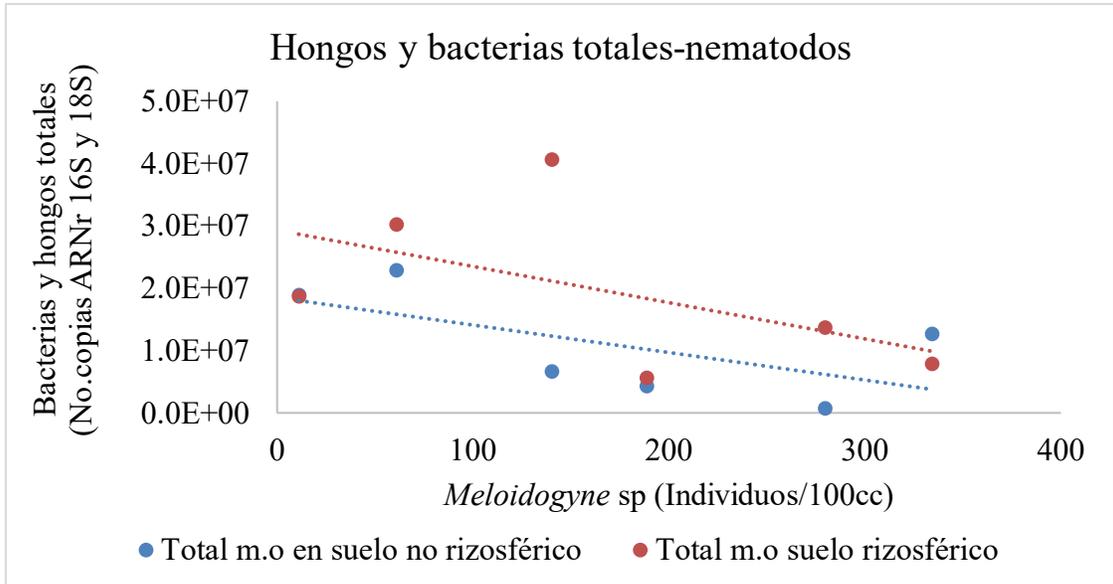
**Figura 9.** Proporción que ocupa cada grupo microbiano (hongos y bacterias) en cada compartimiento. S: Suelo no rizosférico, R: suelo rizosférico y Rp: rizoplano. C: control y T: tratado I: Brotación, II: poscosecha. Letras minúsculas y mayúsculas se utilizan para diferenciar el análisis estadístico realizado en cada compartimiento. Letras diferentes: hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) mediante prueba de comparación de medias de LSD Fisher

En este caso, el efecto directo producido sobre las raíces (crecimiento de pelos absorbentes y liberación de exudados radiculares) de la planta puede favorecer el crecimiento y la colonización de una microbiota donde prevalecen las bacterias.

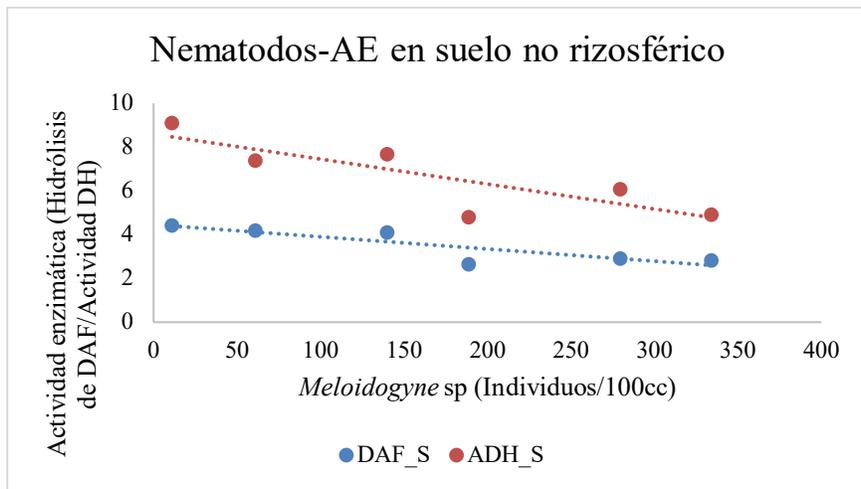
En este estudio se emplearon métodos moleculares como PCR en tiempo real por su versatilidad y por ser muy útil para la cuantificación de hongos y bacterias presentes en el suelo. Algunos estudios demuestran que existe correlación entre el método molecular mencionado y otros métodos de cuantificación convencionales (cuenta en placa) (Massart *et al.*, 2005). Por estas razones se realizaron análisis de correlación entre el total de bacterias y hongos medidos por qPCR, conteo en placas, así como la biomasa microbiana medida a través de métodos indirectos (actividad enzimática).

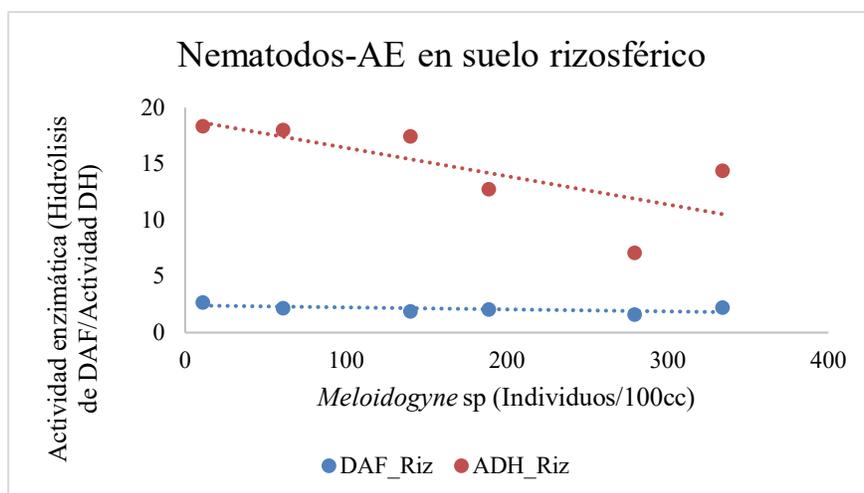


**Figura 10.** Correlación entre bacterias y hongos totales (No. copias ARNr 16S y 18S) y actividad enzimática (Hidrólisis de DAF y Actividad DH). (a) suelo no rizosférico, (b) suelo rizosférico. Etapa fenológica: poscosecha.



**Figura 11.** Correlación entre el total de hongos y bacterias (No. copias ARNr 16S y 18S) (en el suelo no rizosférico y rizosférico) y cantidad de nematodos (Individuos/100cc) en el suelo no rizosférico. Etapa fenológica: poscosecha





**Figura. 12** Correlación entre poblaciones de *Meloidogyne* sp presentes en el suelo rizosférico y actividad enzimática (Hidrólisis de DAF y Actividad DH) (a) en suelo no rizosférico y (b) en suelo rizosférico. Etapa fenológica: poscosecha

En resultados anteriores (Fig. 3a y b) se observó el aumento ( $p < 0.05$ ) de las actividades enzimáticas en el suelo no rizosférico tratado, mientras que el total de bacterias y hongos no varió ( $p > 0.05$ ) entre el suelo no rizosférico control y tratado. Por este comportamiento se observó una correlación positiva pero no significativa (DAF:  $p = 0.13$ ,  $r = 0.65$ ; ADH:  $p = 0.27$ ,  $r = 0.48$ ) entre el total de microorganismos (No. Copias del gen ribosomal ARN 16S y 18S) determinados a partir de qPCR, con las actividades enzimáticas (hidrólisis de DAF y Actividad DH) en suelo no rizosférico (Fig. 10a). En el suelo rizosférico, tanto bacterias como hongos mostraron un aumento ( $p < 0.05$ ) con la aplicación del tratamiento. Sin embargo, sólo el método de actividad DH mostró un aumento significativo en el suelo rizosférico tratado en poscosecha. A pesar de ver la relación que hay entre los microorganismos y la actividad enzimática en este compartimiento, los análisis estadísticos revelan una correlación que tiende a aumentar, pero no significativa (ADH:  $p = 0.24$ ,  $r = 0.60$ ) (Fig. 10b).

La cantidad de nematodos del género *Meloidogyne* se redujo hacia la poscosecha en el suelo no rizosférico tratado (Fig. 6b). El análisis de correlación, tampoco resultó significativo, sin embargo, estas poblaciones muestran una tendencia a disminuir en relación con la cantidad de hongos y bacterias presentes en el suelo ( $p = 0.17$ ,  $r = -0.60$  en suelo no rizosférico y  $p = 0.2$ ,  $r = -0.60$  en suelo

rizosférico) (Fig. 11). La falta de correlación con el nivel de probabilidad adecuado ( $p < 0.05$ ) puede estar vinculados a los valores altos de desviación estándar, que a menudo se observan en estos estudios. Por estas razones se deben tomar precauciones durante la toma de muestras, aumentando su número, la frecuencia de muestreos y evitar los momentos en los que fueron aplicados los tratamientos.

Otro de los análisis corresponde a la correlación entre nematodos y la actividad enzimática. En el suelo no rizosférico tratado las poblaciones de *Meloidogyne* sp mostraron una disminución que se correlaciona de manera negativa con el aumento de la actividad de las enzimas ( $p = 0.026$ ,  $r = -0.828$  para la hidrólisis de DAF y  $p = 0.037$ ,  $r = -0.77$  para la actividad DH). Lo que sugiere que el aumento de la actividad enzimática en este compartimiento, relacionado con el incremento de la biomasa microbiana y con microorganismos que actúan en contra del desarrollo de las poblaciones de nemátodos (Fig. 12a).

Los métodos enzimáticos utilizados en este estudio demuestran que incrementa la biomasa microbiana en la poscosecha en el suelo no rizosférico y rizosférico con el tratamiento aplicado (excepto la hidrólisis de DAF en el suelo rizosférico). Por ello se emplearon técnicas moleculares como qPCR para determinar de modo más exacto el comportamiento de los microorganismos en la rizosfera de la vid. Sin embargo, se observa una disminución de bacterias y hongos en el suelo no rizosférico y el aumento de estos grupos microbianos en el suelo rizosférico en poscosecha en relación con el aumento de la actividad enzimática en ambos compartimientos. Como la diferencia se observa sólo en el suelo no rizosférico, esto sugiere que la microbiota que se desarrolla más es la metabólicamente activa y que actúa en contra del desarrollo de *Meloidogyne* sp. Canchignia *et al.* (2017) probaron el efecto nematicida de 13 cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la raíz y la rizósfera de la vid. Estas cepas además fueron caracterizadas por su acción biocontroladores contra fitopatógenos y su capacidad de secretar enzimas extracelulares (quitinasas, fosfolipasas y proteasas) que tienen potencial nematicida. Por estas razones se cree que el aumento de las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana en este estudio, está relacionado con el aumento de microorganismos que tienen acción contra patógenos en suelo cultivado con vid. Con las técnicas enzimáticas y el conteo de microorganismos y nemátodos por métodos convencionales se observaron diferencias en cuanto al comportamiento del total de bacterias y hongos cuantificados por PCR. Pujol *et al.*, 2005, realizaron recuentos en placas y qPCR para detectar el grado de colonización de la cepa EPS62e de *P. fluorescens* en flores y hojas de manzano.

En este último órgano vegetal no se encontró una fuerte correlación entre ambos métodos. Sus conclusiones sobre este comportamiento también pueden estar relacionadas con lo observado en el presente estudio, pues los métodos moleculares (qPCR) pueden llegar a sobrestimar las poblaciones reales de microorganismos, por la presencia de células viables, pero en estado de latencia, incluso la presencia de material genético en el suelo después de la muerte celular. Razones por las cuales es necesario llevar a cabo varios métodos para complementar el estudio de la estructura de la microbiota edáfica.

#### 6.4. Análisis del Microbioma Presente en el Suelo no Rizosférico y Rizosférico Asociado a las Vides.

Otra estrategia para estudiar la influencia de factores bióticos y abióticos en la estructura y composición del microbioma rizosférico de la vid fue el análisis del metagenoma del suelo no rizosférico, del suelo rizosférico y del rizoplaneo de las raíces en dos etapas de fenológicas del cultivo de vid (brotación y poscosecha). A las 36 muestras recolectadas en total se les extrajo el ADN metagenómico según el protocolo de extracción, registrándose valores de absorbancia en la relación 260/280 entre 1.70 y 2.00 y concentraciones de 5-48 ng/mL. Mediante la secuenciación de amplicones metagenómicos del ARNr 16S a través de la plataforma Illumina MiSeq, se obtuvo un total de 9,289,469 lecturas que fueron procesadas con el programa CLC Genomic Workbench 9.0 complementado con CLC Microbial Genomic Module 1.3 (Qiagen, Denmark). Luego de la combinación de secuencias antiparalelas homólogas y el recorte a una longitud fija de 439 pb, fueron removidas las quimeras y las muestras con un número de lecturas menor al 50% de la mediana.

Un total de 1,696,279 lecturas se compararon con la base de datos SILVA 16S Versión 123 (Quast *et al.*, 2013) y se agruparon en 26,332 OTU, obteniéndose 17,810 OTUs *de novo*, con un 97% de identidad entre las mismas. Las clases más abundantes en las muestras de suelo, rizosfera y rizoplaneo fueron *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetacea* y *Bacteroidia*. Los representantes microbianos pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidia* mostraron un comportamiento similar,

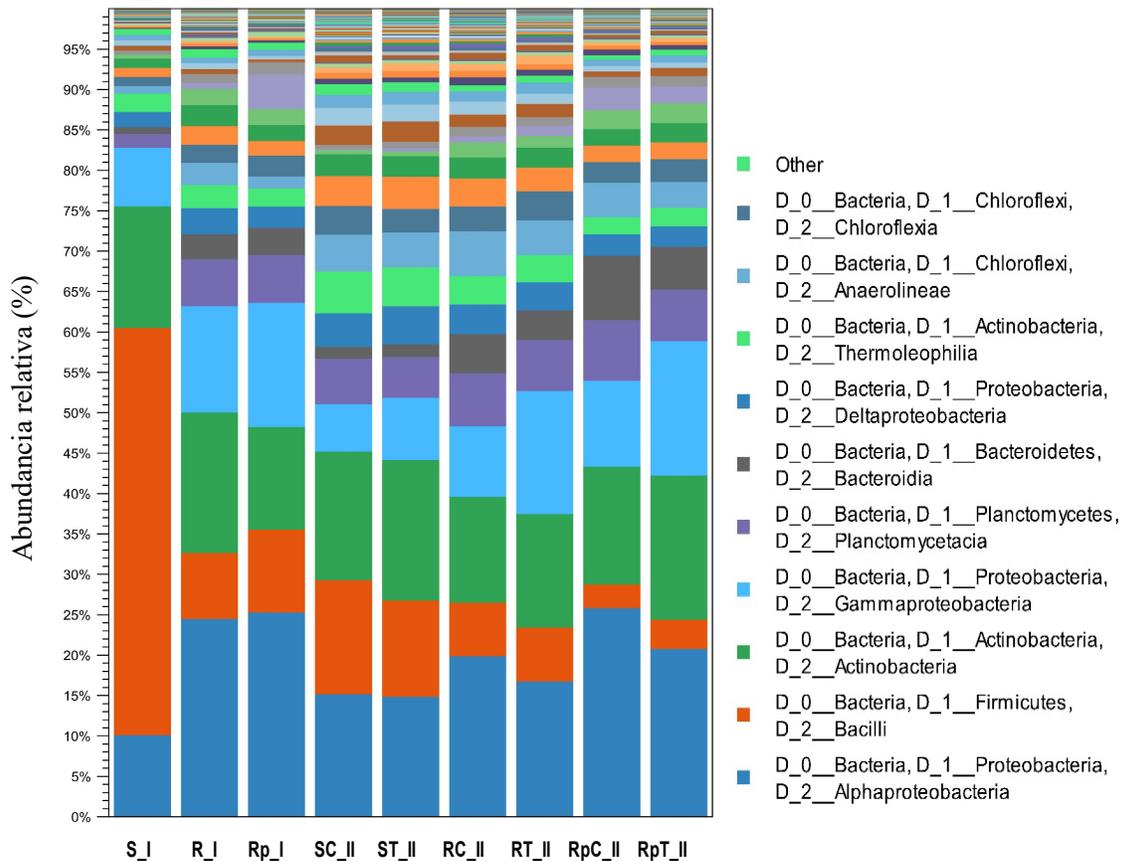
una abundancia relativa menor en el suelo no rizosférico con un aumento hacia la rizosfera y el rizoplano, en las dos etapas fenológicas del cultivo. La clase *Planctomycetacea* también mostró una abundancia menor en el suelo no rizosférico y un aumento hacia los compartimientos rizosféricos, sin embargo, en la etapa de poscosecha su abundancia se mantuvo constante en todos los compartimientos (suelo no rizosférico, rizósfera y rizoplano). La mayor abundancia relativa de la clase *Bacilli* se observó en las muestras de suelo no rizosférico en el estado de brotación del cultivo que disminuye en el orden suelo no rizosférico, rizosfera, rizoplano; con una reducción significativa en la etapa de poscosecha del cultivo. Sin embargo, la clase *Actinobacteria* se mantuvo constante en su abundancia a lo largo de los compartimientos no rizosférico y rizosférico en las dos etapas muestreadas (Fig.13).

La clase *Bacilli* ocupó aproximadamente el 50% de la abundancia en el suelo no rizosférico control, destacándose los géneros *Bacillus* y *Planomicrobium*. Sin embargo, esta clase presentó una reducción clara en el suelo no rizosférico control y tratado hacia la etapa de poscosecha. El aumento de este género anteriormente se relacionó de manera hipotética con el desarrollo de poblaciones de solubilizadores de P, ocasionado por el crecimiento de la planta hacia la poscosecha. Sin embargo, estos resultados indican lo contrario, por lo que únicamente se pueden las especies de *Bacillus* cultivables y otros géneros que no son tan abundantes en el suelo no rizosférico.

En el suelo rizosférico y rizoplano la clase *Alphaproteobacteria* mostró la mayor abundancia durante la brotación del cultivo. Uno de los géneros más representativos encontrado dentro de esta clase fue *Rhizobium*, género que se redujo hacia la poscosecha en las muestras control y tratadas. *Rhizobium* sp se caracteriza por cumplir funciones en la rizósfera asociados a la fijación de N. Contrario a estos resultados, en el estudio de microorganismos cultivables el crecimiento de las poblaciones de fijadores se vio favorecido hacia la poscosecha. Por lo que mantenemos la idea de que otros géneros como *Burkholderia*, *Azotobacter* o *Azospirillum*, aunque presenten una menor abundancia están relacionados con esta función.

La clase *Gammaproteobacteria* también fue más abundante en el suelo rizosférico y en el rizoplano durante a inicios de la brotación. Sin embargo, a finales de la cosecha, se observó un aumento de *Pseudomonas* sp, género más representativo de esta clase. En ambos compartimientos se vio una mayor abundancia con el efecto del tratamiento. La mayor cantidad de UFC/g de este género se había observado por efecto de la etapa fenológica de la planta. Sin embargo, los estudios a nivel

molecular reflejan la presencia de formas no cultivables que aumentan por el efecto indirecto de los bioestimulantes.



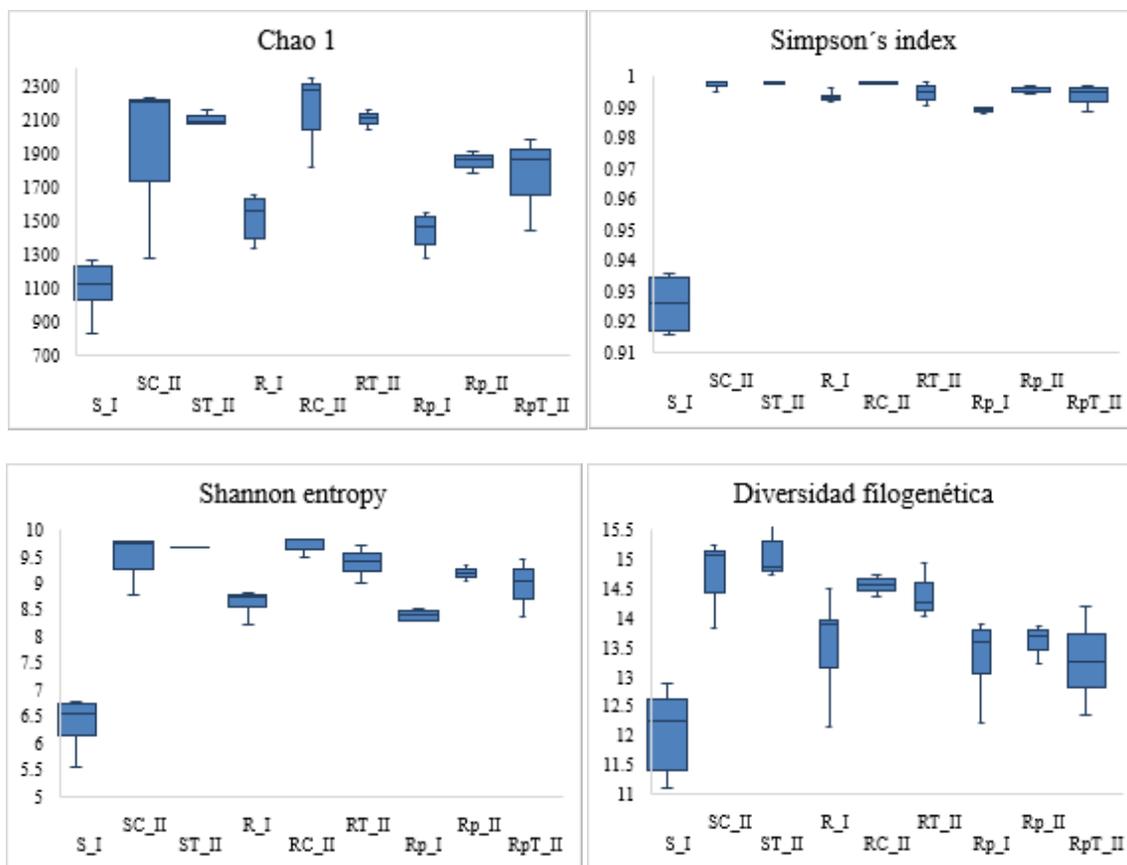
**Figura 13.** Abundancia relativa de las clases más representativas en suelo (S), rizósfera (R) y rizoplano (Rp).SC: suelo control, ST: suelo tratado, RC: rizósfera control, RT: rizósfera tratada, RpC: rizoplano control, RpT: rizoplano tratado. I: Brotación, II: poscosecha

#### 6.4.1. Diversidad Dentro (diversidad $\alpha$ ) y entre las Muestras de Suelo, Rizosfera y Rizoplano (Diversidad $\beta$ ).

Las medidas de diversidad dentro de las muestras (diversidad  $\alpha$ ) en cada etapa fenológica se analizaron a través de un ANOVA de una vía, comparando las medias con la prueba LSD de Fisher.

Los índices de Simpson y Shannon, sensibles a la igualdad y la abundancia de la comunidad microbiana, variaron entre 0.889-0.998 y 5.55-9.822, respectivamente. Chao-1 es particularmente apropiado para conjuntos de datos donde la mayoría de los taxones son relativamente raros en la comunidad y las estimaciones de riqueza través de este índice oscilaron entre 824.5 y 2343. Mientras que la diversidad filogenética osciló entre 11.109 y 15.721. Esta última medida basada en las distancias genéticas entre especies, informa sobre la relación evolutiva y qué tan semejantes filogenéticamente son las especies dentro de la muestra (Wang *et al.*, 2016).

A partir de los índices de Chao-1 y Shannon se determinó la menor diversidad  $\alpha$  en la etapa de brotación de la vid en todos los compartimientos. No obstante, al comparar todos los valores de diversidad en esta etapa, en el suelo no rizosférico se observaron los valores más bajos de diversidad  $\alpha$  (Chao1:  $1099 \pm 165.3$ ; Simpson:  $0.921 \pm 0.017$ ; Shannon:  $6.374 \pm 0.493$  y Diversidad filogenética:  $12.057 \pm 0.773$ ) (Fig.14). Estos índices de diversidad aumentaron hacia la poscosecha ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observaron cambios en esta etapa ( $p > 0.05$ ) dentro de los rizocompartimientos provocados por el tratamiento. La diversidad filogenética fue menor en el suelo no rizosférico con un aumento ( $p < 0.05$ ) determinado por el desarrollo de la planta. En el resto de los compartimientos no hubo efecto (prueba de comparación de medias por LSD Fisher,  $p = 0.005$ ) de ninguno de los factores evaluados.



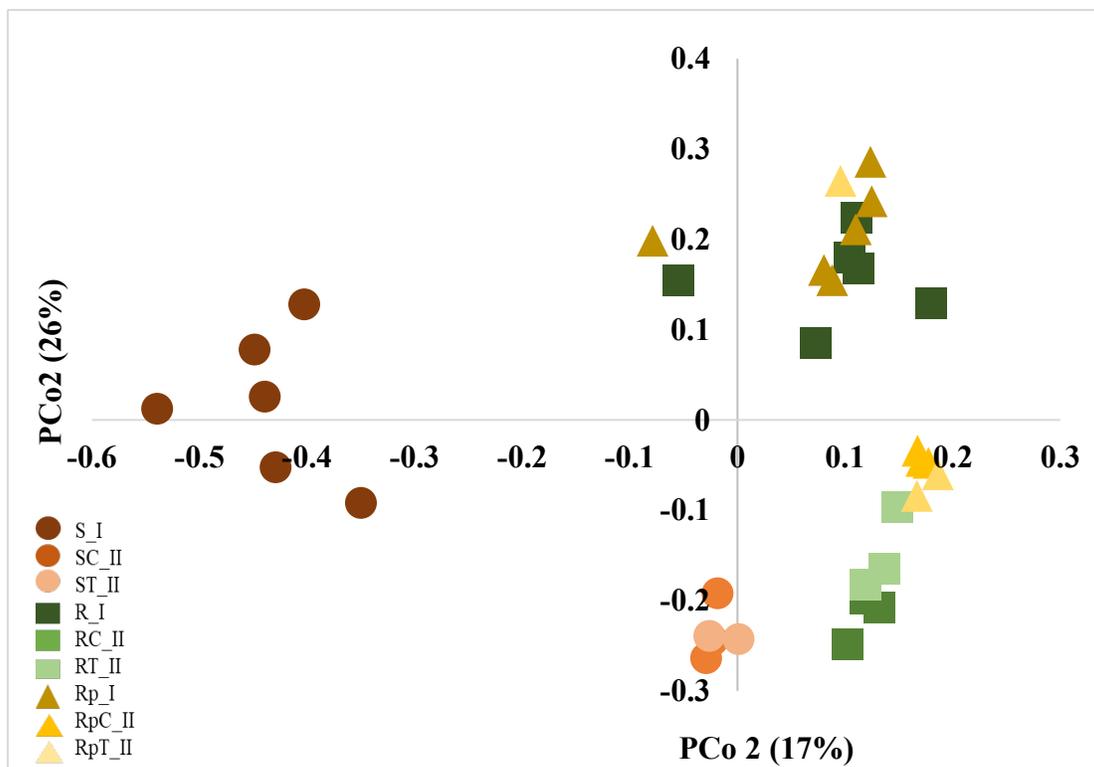
**Figura 14.** Diversidad  $\alpha$  (dentro de la muestra) entre los compartimientos suelo (S), rizosfera (R) y rizoplano (Rp) calculada a partir de los índices Chao-1, Simpson index, Shannon entropy y diversidad filogenética. Las barras horizontales dentro de las cajas representan la mediana. Las partes superior e inferior de las cajas representan los cuartiles 75 y 25, respectivamente. I: brotación y II: poscosecha.

La consulta de la base de datos SILVA 16S reveló una afiliación del 87% de las OTUs a géneros bacterianos conocidos en la etapa de brotación, mientras que el resto se marcó como no asignado. Del total de OTUs bacterianas, se asignó el 32% al filo *Proteobacteria*, siendo los géneros más abundantes: *Devosia*, *Pedomicrobium*, *Rhizobium*, *Massilia*, *Pseudomonas*, *Steroidobacter* y *Pseudomonas*; seguido del filo *Firmicutes* (28%) con los géneros *Bacillus*, *Planococcus* y *Planomicrobium*. Los géneros *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Actinoplanes* y *Streptomyces* fueron los más abundantes dentro del filo *Actinobacteria* (22%), además de *Planctomycetes* que sólo representó el 4% del total de OTUs. Hacia la poscosecha, sólo el 83% de las OTUs fueron asignadas a taxones bacterianos, marcando el resto como no asignado. En esta etapa varió la

abundancia de los filos: *Proteobacteria* 36% (géneros: *Pedomicrobium*, *Rhizobium*, *Rhodomicrobium*, *Steroidobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*), *Actinobacteria* 26% (*Mycobacterium*, *Geodermatophilus*, *Arthrobacter*, *Actinoplanes*, *Nocardioideis*), *Firmicutes* 8% (*Bacillus*) y *Acidobacteria* 4% (Anexo 6).

A partir del análisis de coordenadas principales (PCoA) a un nivel de OTU del 97% de similitud, utilizando la matriz de distancia de Bray Curtis obtenidas del conjunto de datos de la secuenciación dirigida al ARNr 16S, se analizaron las distancias de las comunidades microbianas en las distintas etapas estudiadas y según la aplicación del tratamiento con bioestimulantes (Fig.15).

Los mayores cambios en la composición de la comunidad bacteriana se observaron a lo largo del eje 1 de PCoA (explicando sólo el 26% de la variación) en respuesta al estado fenológico de la planta. La distribución de las comunidades microbianas en el suelo fue diferente con una mayor separación de la microbiota residente en la rizosfera y rizoplano (PERMANOVA, suelo-rizosfera: pseudo f-statistic 8.941,  $p=0.002$ ; suelo-rizoplano: f-statistic: 8.406,  $p=0.002$ , Anexo 5). También se encontraron patrones diferentes en la distribución de los microbiomas de rizosfera y rizoplano (I: Brotación, PERMANOVA,  $p<0.05$ ). No se observaron cambios ni patrones de separación significativos de la microbiota asociada a suelo no rizosférico, rizosfera y rizoplano de vides tratadas en la segunda etapa del experimento (II: Poscosecha, PERMANOVA,  $p>0.05$ ) (Anexo 5). Los cambios más significativos se observaron entre las poblaciones bacterianas que habitan el suelo, en las distintas etapas de desarrollo de la planta que fueron muestreadas. Estos cambios no son frecuentes en el suelo, sin embargo, las raíces del cultivo de vid podrían también influir en el comportamiento de la microbiota que reside en este microhábitat.



**Figura 15.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de la matriz de Bray Curtis para el análisis de la diversidad  $\beta$  (entre las muestras). S: suelo, R: rizosfera, Rp: rizoplano (Control: C y Tratado: T) en las etapas fenológicas: I: Brotación y II: Poscosecha.

Debido a que, en un solo ambiente, las diferentes especies de plantas o incluso un único cultivar tiene una fuerte influencia sobre las comunidades microbianas, lo que aumenta la posibilidad de que la recolección de muestras de suelos no rizosféricos pueda ser influenciado por las plantas en la vecindad inmediata del muestreo (Andrew *et al.*, 2012).

La composición y las proporciones de los filos bacterianos más abundantes (>1%) encontrados en nuestro estudio, en su mayoría siguieron patrones taxonómicos similares a los revelados por otros grupos (Liu *et al.*, 2014; Burns *et al.*, 2015; Hendgen *et al.*, 2018) en regiones vitivinícolas. En general, las bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* son las más abundantes en distintas partes de la vid (Pinto *et al.*, 2016, Zarraoindia *et al.*, 2015) similar a lo que observamos en este estudio. Además de estos antecedentes, algunas clases bacterianas como *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* y otras fueron observadas por Marasco *et al.*, 2018 en suelos cultivados con *Vitis vinifera* var. Barbera, lo que sugiere una alta conservación en el

genotipo hospedero de estos filos bacterianos, independientes de la localización geográfica. Andrew *et al.*, 2012 encontraron en suelos del desierto de Sonora como filos altamente representativos a *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetacia* y *Firmicutes*. Estos filos también fueron encontrados en el presente estudio en un suelo agrícola, por lo que también se puede establecer cierta similitud entre los taxones según el tipo y la localización geográfica de suelos naturales.

Estudios basados en el análisis de ácidos grasos derivados de fosfolípidos (PFLA), refieren a que las comunidades microbianas en los suelos agrícolas perennes son más similares a los presentes en ecosistemas naturales donde abundan ciertos filos como *Proteobacterias*, *Actinobacterias*, *Acidobacterias* y *Bacteroidetes* (Lauber *et al.*, 2009, Drenovsky *et al.*, 2010). Como PFLA explica la composición de las comunidades microbianas vivas, esto puede explicar los diferentes resultados cuando se analiza el microbioma a través de métodos de secuenciación profunda como se emplea en nuestro estudio.

Los géneros más abundantes encontrados en el suelo no rizosférico fueron *Bacillus* y *Planomicrobium* del filo *Firmicutes*, además de *Arthrobacter* que pertenece al filo *Actinobacteria*. Según el porcentaje que representan estos géneros en el suelo, se vio una reducción hacia la poscosecha, en el suelo control y tratado con los bioestimulantes. Sin embargo, con las técnicas de recuento en placas en este mismo compartimiento, se observó un aumento de *Pseudomonas* sp, que también se reconoce por su capacidad de solubilizar fosfato. El factor más importante que influyó en el aumento de estas poblaciones fue el estado fenológico de la planta y en el caso de los solubilizadores de P, también aumentaron con el tratamiento (Fig. 4 y 5). El comportamiento diferente que se muestra en estos resultados se debe a que los métodos tradicionales sólo tienen en cuenta los microorganismos cultivables, a diferencia de las técnicas moleculares que si describe toda la microbiota incluyendo a bacterias no cultivables y que se encuentran en estado de latencia en el suelo. En la rizosfera y el rizoplano las abundancias de *Pseudomonas* y *Rhizobium* (*Proteobacteria*) fueron similares. En análisis de bacterias endófitas de *Vitis vinifera* cv Chardonnay en un viñedo de más de 10 años, los microorganismos más abundantes fueron *Bacillus* y *Pseudomonas* (West *et al.*, 2010). La disminución de la diversidad fúngica y el comportamiento estable de algunos géneros bacterianos también se han observado en viñedos, donde la modulación de estas poblaciones microbianas ha estado determinada por los efectos de tratamientos químicos (West *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2014). En estas investigaciones se encontraron similitudes en cuanto

a algunos géneros bacterianos identificados en la variedad de *Vitis vinifera* en estudio, corroborando la suposición de que los cambios en la microbiota rizosférica y en la actividad enzimática se hubiesen explicado mejor con la identificación y la organización de las poblaciones fúngicas, que no se tuvieron en cuenta en este estudio.

Las medidas de diversidad dentro de las muestras (diversidad  $\alpha$ ) revelaron un gradiente que va desde la rizosfera hacia el rizoplano, siendo menor en el suelo no rizosférico durante la etapa de brotación, observando un aumento de la riqueza de especies bacterianas hacia la etapa de poscosecha. En esta última etapa, hubo mayor diversidad respecto a la brotación producto de los cambios fisiológicos del cultivo como se ha visto hasta el momento. Sin embargo, no se observaron diferencias marcadas por el tratamiento en ninguno de los compartimientos rizosféricos estudiados. La diversidad filogenética también mostró mayores índices hacia la poscosecha, excepto en la rizosfera y el rizoplano, donde se mantuvieron iguales estos valores, Lo que sugiere que las especies presentes en el suelo no rizosférico son diferentes filogenéticamente a las que habitan en este mismo compartimiento hacia la segunda etapa del experimento.

A partir de este análisis se concluye de manera parcial que la riqueza de las especies fue mayor hacia la poscosecha; sin embargo, hay algunos géneros que disminuyen el número de representantes hacia esa segunda etapa, por lo que la mayor diversidad puede ser explicada por otros géneros que se encuentran en menor abundancia.

Las comunidades microbianas en el suelo no rizosférico, generalmente albergan una mayor diversidad (hasta  $10^4$  especies de bacterias /g) (Berendsen *et al.*, 2012). Contrario a lo que se describe en la literatura, en el suelo no rizosférico durante la etapa de brotación del cultivo, encontramos una baja diversidad de las especies, quienes mostraron, además, una separación filogenética significativa respecto a las poblaciones bacterianas que abundan en la rizosfera y el rizoplano (Prueba LSD de Fisher en Brotación, diversidad filogenética).

La composición de las comunidades microbianas del suelo puede estar determinada por algunos factores como la disponibilidad de inóculos de inmigrantes, la fenología de la planta hospedera, las condiciones ambientales físico-químicas y las características nutricionales de la filosfera o el suelo. Los primeros 20-30 cm del suelo o la capa superficial de suelo, se considera un ambiente donde hay mayor cantidad de N y C, en relación con el subsuelo, y pueden desarrollarse los microorganismos. De este modo, los cambios de estos factores pueden dar origen a adaptaciones en grupos microbianos específicos, incluso modificar algunas de sus funciones (Eilers *et al.*, 2012).

En el presente estudio, la profundidad del suelo en la toma de muestras fue igual en los tres compartimientos y en las dos etapas fenológicas del cultivo, descartando estas como una de las posibles causas de variación de la microbiota rizosférica.

Otros factores que también afectan el microbioma de la raíz son propiedades como pH, temperatura, humedad, disponibilidad de O<sub>2</sub>, el contenido de agua, la relación C: N y la textura del suelo, que son conductores de los patrones biogeográficos de las comunidades microbianas del suelo (Burns *et al.*, 2015). La baja disponibilidad de materia orgánica y la poca retención de agua que caracteriza a estos suelos franco arenosos puede disminuir las condiciones para el establecimiento de grupos microbianos en el suelo no rizosférico que, a pesar de tener pocas raíces, tienen una menor influencia de los metabolitos exudados por las raíces de la planta, que los que habitan más cerca de estas estructuras. Justamente, la variabilidad en el suministro de nutrientes entre estos nichos puede explicar en parte las diferencias observadas en la estructura de la comunidad bacteriana, así como la diversidad de géneros cultivables entre las diferentes partes de la planta y en el suelo (Martins *et al.*, 2013).

Se sabe además que las plantas ejercen una influencia selectiva sobre los microbios del suelo, que albergan poblaciones bacterianas específicas de especie y específicas de cultivar (Marschner *et al.*, 2001; Acosta-Martínez *et al.*, 2008). En entornos de agua y nutrientes limitados, la hipótesis de la isla de recursos sugiere que la diversidad bacteriana debería ser mayor en la rizosfera que en el suelo circundante, debido a la acumulación de nutrientes en la interfaz de la raíz y el suelo. Por estas razones se cree que este efecto rizosférico se acentúa en los desiertos, tanto cualitativamente como cuantitativamente, para casi todos los tipos metabólicos de bacterias (Bhatnagar y Bhatnagar, 2005; Andrew *et al.*, 2012). Se conoce que el genotipo de la planta influye en el reclutamiento de su propio microbioma, a través de los distintos patrones de exudación que se obtienen en las diferentes etapas de desarrollo de la vid; comportamiento que confirma, además, la hipótesis de que la edad de la planta es un factor importante en la determinación de la composición del microbioma de la raíz (Chaparro *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018 b). Estas consideraciones explican de alguna manera los cambios en la composición del microbioma rizosférico de la vid en las dos etapas fenológicas seleccionadas para este estudio, además de la menor diversidad dentro de las muestras de suelo rizosférico a inicios de la brotación de este cultivo.

## 7. CONCLUSIONES

La aplicación de los bioestimulantes modificó el comportamiento de la microbiota rizosférica de vid, en menor medida respecto al estado fenológico de la vid, favoreciendo el desarrollo de una mayor actividad microbiana y el establecimiento de microorganismos solubilizadores de P en el suelo no rizosférico. Además, las clases *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidia* fueron más abundantes en el suelo no rizosférico y rizosférico con la aplicación de los bioestimulantes.

La estructura y diversidad de las comunidades microbianas en suelos rizosféricos de vid se modificó en función del estado fenológico de la planta, lo que favoreció el aumento de mesófilos aerobios, fijadores de N y *Pseudomonas* sp hacia la poscosecha en el suelo no rizosférico sin tratamiento, reflejando el efecto del desarrollo de la planta sobre estos microorganismos, benéficos en su mayoría, y su posible acción en la reducción de *Meloidogyne* sp.

La menor disponibilidad de nutrientes que presentan los microorganismos en ecosistemas áridos, proporcionó una menor diversidad en el suelo no rizosférico de vid durante la etapa de brotación del cultivo.

## **8. RECOMENDACIONES**

Para futuros estudios sobre el comportamiento de la microbiota en suelos agrícolas, se recomienda mejorar el modelo explicativo al incluir mediciones de parámetros físicos y químicos del suelo, así como una evaluación detallada de los parámetros biométricos del cultivo en estudio para correlacionar estos datos con la riqueza y composición de las especies en cultivos perennes. Además de tomar muestras sin raíces representativas del suelo circundante., que sean utilizadas como control.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelfattah A., Malacrino A., Wisniewski M., Cacciola S.O., Schena L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control* 120:1-10.
- Acosta Y. y Paolini J. (2005). Actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo Calciothids enmendado con residuos orgánicos. *Agron. Trop.* 55(2):217-232.
- Acosta-Martínez V., Dowds S., Sun Y., Allen V. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biol. Biochem.* 40:2762-2770.
- Adam G., Duncan H. (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 943-951
- Ahkamia A.H., White R.A., Handakumburaa P.P., Jansson C. 2017. Rhizosphere engineering: Enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere* 3: 233–243.
- Andreolli M., Zapparoli G., Angelini E., Lucchetta G. Lampis S., Vallini G. (2019). *Pseudomonas protegens* MP12: una bacteria endofítica promotora del crecimiento de las plantas con actividad antifúngica de amplio espectro contra los fitopatógenos de la vid. (219): 123-131.
- Andrew D.R., Fitak R.R., Munguia-Vega A., Racolta A., Martinson V.G., Dontsovag K. (2012) Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran desert soils.
- Averill, C., Turner, B.L., Finzi, A.C., 2014. Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. *Nature.* 505(7484): 543-5.
- Baetz U. y Martinoia E. (2014). Los exudados de la raíz: la parte oculta de la defensa de la planta. *Planta de tendencias. Sci.* 19: 90-98.
- Bakke I., De Schryver P., Boon N., Vadstein O. (2011). PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *Journal of Microbiological Methods.* 84: 349-351.
- Casida L. E., Jr., Klein D.A., Santoro T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98:371-376.
- Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science.* 8 (17): 478-486.
- Berg G., Rybakova D., Grube M., Köberl M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany.* 67: 995-1002 (a).
- Berg G., Smalla K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 1-13 (b).
- Bertolini V., Montaña N.M., Chimal E., Varela L., Gómez J., Martínez J.M. (2018). Abundancia y riqueza de hongos micorrizógenos arbusculares en cafetales de Soconusco, Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical* 66 (1): 91-105.

<https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.27946>.

- Bevivino A., Paganini P., Bacci G., Florio A., Pellicer M.S., Papaleo M.C., Mengoni A., Ledda L., Fani R., Benedetti A., Dalmastrì C. (2014). Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*. 9:8e105515.
- Bhatnagar A., Bhatnagar M. (2005). Microbial diversity in desert ecosystems. *Curr. Sci.* 89:91-100.
- Bowles T.M., Acosta Martínez V., Calderón F., Jackson L.E. (2014). Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 252-262
- Bragg L., Tyson G.W. (2014). Metagenomics using next-generation sequencing. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*.183-201.
- Braun B., Bockelmann U., Grohmann E., Szewzyk U (2006). Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with in situ and culture-dependent methods. *Appl. Soil Ecol.* 31: 267-279.
- Breullin F., Schramm J., Hajirezaei M., Ahkami A., Favre P., Druège U., Hause B., Bucher M., Kretschmar T., Bossolini E., Kühlemeier C., Martinoia E., Franken P., Scholz U., Reinhardt D. (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal*. 64: 1002-1017.
- Brunetto G., Bastos de Melo G.W., Terzano R., Del Buono D., Astolfi S., Tomasi N., Pii Y., Mimmo T., Cesco S. (2016). Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. *Chemosphere*. 162: 293-307.
- Bulgarelli D., Rott M., Schlaeppi K., Ver Loren van Themaat E., Ahmadinejad N., Assenza F., Rauf P., Huettel B., Reinhardt R., Schmelzer E., Peplies J., Gloeckner F.O., Amann R., Eickhorst T., Schulze-Lefert P. (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 488(7409):91-95 (a).
- Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*. (64) 807-838 (b)
- Burns K.N., Kluepfel D.A., Strauss S.L., Bokulich N.A., Cantu D., Steenwerth, K.L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biol Biochem*. 91: 232-47.
- Cadena-Zamudio J.D., Martínez-Peña M.D., Guzmán-Rodríguez L.F., Arteaga-Garibay R.I. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*. 6(2):70-83.
- Calvo P., Nelson L., Kloepper J.W. (2014). Usos agrícolas de bioestimulantes de plantas. *Plant Soil*. 383:3-41.
- Canchignia H., Altimira F., Montes C., Sánchez E., Tapia E., Miccono M.A., Espinoza D., Aguirre C., Seeger M., Prieto H. (2017). Candidate nematicidal proteins in a new *Pseudomonas*

*veronii* isolate identified by its antagonistic properties against *Xiphinema index*. J Gen Appl Microbiol. 63:11-21.

- Castañeda L.E., Barbosa O. (2016). Análisis metagenómico que explora la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades microbianas del suelo en viñedos chilenos y bosques nativos circundantes. PeerJ PrePrints 4: e1661v1
- Castillo-Monroy A., Sánchez-Rodríguez A., Cueva A., Orellana Ordoñez M. (2016). Puesta a punto de una técnica molecular para el estudio de hongos y bacterias totales de suelo en ecosistemas tropicales del sur de Ecuador. Ciencia del suelo. 34(1):145-154.
- Cedeño D.A., Canchignia H.F., Cruz N., Guerra F.F., Fernández R.G., Cedeño A.V. (2017) Rizobacterias que promueven el desarrollo e incremento en productividad de *Glycine max* L. Ciencia y Tecnología. 10: 7-15.
- Cerón Rincón L., & Melgarejo Muñoz L. (2005). Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. Acta Biológica Colombiana.10 (1): 5-18.
- CESAVE - SIAFESON, 2019. Red de Estaciones Meteorológicas Automáticas de Sonora ([www.siafeson.com/remas](http://www.siafeson.com/remas)).
- Chaparro J.M., Badri D.V., Vivanco J.M. (2014) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. ISME J 8:790-803.
- Chen T.H.H., Murata N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. Plant Cell Environ. 34:1-20.
- Chi-Chu L. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. J Environ Sci. Health.45:348-359.
- Chillappagari S., Seubert A., Trip H., Kuipers O.P., Marahiel M.A., Miethke M. (2010). Copper stress affects Iron homeostasis by destabilizing Iron-Sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 192: 2512-2524.
- Cocolin L., Bisson L.F., Mills D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiol. 189:81-87.
- Cocolin L., Alessandria V., Dolci P., Gorra R., Rantsiou K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation during food fermentation. Int Journal Food Microbiol. 167(1):29-43.
- Colla G., Roupheal Y., Di Mattia E., El-Nakhel C., Cardarelli M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as abiostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. J. Sci. Food Agric. 95: 1706-1715.
- Condemarín C., Oyola M., Mialhe E., Quimi J., Astudillo S., Gutiérrez S., Barreto C., Túllume C., Duarte P., León G. (2018). Efecto de bacterias nativas del suelo cultivado y prístino sobre el control del nematodo agallador radicular *Meloidogyne javanica*, en condiciones in vitro y producción de biomasa. Arneloa. 25(2): 515-528.
- Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (2012a) EBIC y bioestimulantes en breve. <http://www.biostimulants.eu/>
- 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. 3(28):

274-285.

- Cortés-López N., Montor-Antonio J., Olvera-Carranza C., Peña-Castro J., del Moral, Ventura S. (2014). Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1 (7): 45-58.
- Cuenca G. (2015). *Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados*. Caracas, Venezuela: Ediciones IVIC, Instituto venezolano de Investigaciones Científicas.
- De la Paz-Jiménez, M., De la Horra, A.M., Pruzzo, L., & Palma, R.M. (2002). Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology Fertility Soils*.35:302–306.
- Dessaux Y., Grandclément C., Faure D. (2016). Engineering the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*. 3(21): 266-278.
- Dhingra O. D y Burton J. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC press, Cleveland, Ohio, 1995.
- 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. *Agron. Sustain. Dev*. 32:227-243.
- Drenovsky R.E., Steenwerth K.L., Jackson L.E., Scow K.M. (2010). Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Global Ecology and Biogeography* 19: 27-39.
- du Jardin P. (2012). *The Science of Plant Biostimulants-A bibliographic analysis*. Adhoc Study Report to the European Commission DG ENTR. [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/fertilizers/final\\_report\\_bio\\_2012en.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/fertilizers/final_report_bio_2012en.pdf).
- du Jardin P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3-14.
- Edwards J., Johnson C., Santos-Medellín C., Lurie E., Kumar Podishetty N., Bhatnagar S., Eisen J.A., Sundaresan V. (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *PNAS*. 911-920.
- Eilers K.G., Debenport S., Anderson S., Fierer N. (2012) Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 50: 58-65.
- European Biostimulants Industry Council (2016). *EBIC and Biostimulant in Brief*. <http://www.biostimulants.eu>
- Fantini E., Gianese G., Giuliano G., Fiore, A. (2015). Bacterial metabarcoding by 16S rRNA gene ion torrent amplicon sequencing. *Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols*. 77-90.
- Feng Y., Motta A.C., Reeves D.W., Burmester C.H., Van Santen E., Osborne J.A. (2003). Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biol Biochem*.35(12):1693-1703.
- Fincheira-Robles P., Martínez-Salgado M.M., Ortega- Blu R., Janssens M., Parada-Ibañez M. (2018). Indicadores de calidad de suelo en uva de mesa (*Vitis vinifera* cv. Thompson seedless) bajo manejo integrado de nutrición. *Scientia Agropecuaria*. 9(1): 17-24.
- Fuentes-Ramírez A., Barrientos M., Almonacid L., Arriagada-Escamilla C., Salas-Eljatib C.

- (2018). Short-term response of soil microorganisms, nutrients and plant recovery in fire-affected *Araucaria araucana* forests. *Applied Soil Ecology*. 131: 99-106
- García F., Morugán-Coronado A., Zornoza R., Cerdà A., Scow K. (2013). Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices a mediterranean agro-ecosystem. *PloS ONE*. 8(11):e80522.
- Gilbert J.A., Jansson J.K, Knight R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *J. Biol.*12(69):1-4.
- Gooris J. & D'Herde C.J. (1969). On the infection and damage to some field crops caused by the grass root nematode *Meloidogyne naasi*. *Revue Agricole*. 22: 581-590.
- Guerrero B., Velandia M., Fischer G., Montenegro H. (2007). Plant extracts carboxylic acids and soil humidity influence production and cracking of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*. 1(1): 9-19.
- Guerrero-Ortiz P.L., Quintero-Lizaola R., Espinoza-Hernández V., Benedicto-Valdés G.S., Sánchez-Colín M.J. (2012). Respiración de CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra Latinoamericana*. 4 (30):355-362.
- Hai B., Diallo N.H., Sall S., Haesler F., Schauss K., Bonzi M., Assigbetse K., Bonzi M., Assigbetse K., Chotte J.L., Munch J.C., Schloter M. (2009). Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems. *Applied and environmental microbiology*. 75(15): 4993-5000.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 186: 1-85.
- Hamady M, Lozupone C, Knight R (2010). Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data, *ISME J*. 4 (1): 17
- Hanson C.A., Fuhrman J.A., Horner-Devine M.C., Martiny J.B.H. (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat. Rev. Microbiol*. 10:497-506.
- Hellequin E., Monard C., Quaiser A., Henriot M., Klarzynski O., Binet F. (2018) Specific recruitment of soil bacteria and fungi decomposers following a biostimulant application increased crop residues mineralization. *PLoS ONE*. 13(12): e0209089.
- Hendgen M., Hoppe B., Döring J., Friedel M., Kauer R., Frisch M., Dahl A., Kellner H. (2018). Effects of different management regimes on microbial biodiversity in vineyard soils. *Scientific reports*.8:9393
- Hernandez M. M., & Menéndez C. M. (2019). Influence of seasonality and management practices on diversity and composition of fungal communities in vineyard soils. *Applied Soil Ecology*. 135: 113-119.
- Hinojosa M., Garcia-Ruiz R., Carreira J.A. (2010). Utilizing microbial community structure and function to evaluate the health of heavy metal polluted soils. In: Sherameti, I., Varma, A. (Eds.), *Soil Biology: Soil Heavy Metals*. 184-224
- Hintze J. (2007). *NCSS 2007 user guide*. Kaysville, Utah: Number Cruncher Statistical Systems Software NCSS.

- Hu L., Robert C.A.M., Cadot S., Zhang X., Ye M., Li B, Manzo D., Chervet N., Steinger T., van der Heijden M.G.A., Schlaeppli K., Erb M. (2018). Root exudate metabolites drive plant soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications*. 9:27-38.
- Ingham E. R., & Klein, D. A. (1984). Soil fungi: Relationships between hyphal activity and staining with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*. 16(3): 273-278.
- Jindo K., Martim S.A., Navarro E.C., Aguiar N.O., Canellas L.P. (2012). Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organicwastes. *Plant Soil*. 353: 209-220.
- Kauffman J.K., Kneivel D.P., Watschke T.L. (2007). Efectos de un bioestimulante en la tolerancia al calor asociada con la capacidad fotosintética, la termoestabilidad de la membrana y la producción de polifenoles del ryegrass perenne. *Crop Sci*. 47: 261-267.
- Kaur R., Rajesh Ch., Sharma R., Kaur Boparai J., Kumar Sharma P. (2018). Metagenomic investigation of bacterial diversity of hot spring soil from manikaran, himachal pradesh, India. *Ecological Genetics and Genomics* 6:16–21.
- Killham K., Prosser J.I. (2014). The bacteria and Archaea. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 41.
- Klein D.A., Loh T.C., Goulding R.L. (1971). A rapid procedure to evaluate the dehydrogenase activity of soils low. *Soil Biol. Biochem*. 3: 385-387.
- Kumar S., Chaudhuri S., and Maiti S.K. (2010). Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil-A review. *Environment and Ecology Research*. 30 (11).
- Lakshmanan V., Ray P., Craven K.D. (2017). Rhizosphere Sampling Protocols for Microbiome (16S/18S/ITS rRNA) Library Preparation and Enrichment for the Isolation of Drought Tolerance-Promoting Microbes. *Methods Mol Biol*. 1631:349-362. Bais P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol*. 57:233-266.
- Lange M., Eisenhauer N., Sierra C.A., Bessler H., Engels C., Griffiths R.I., Mellado- Vázquez P.G., Malik A.A., Roy J., Scheu S., Steinbeiss S., Thomson B.C., Trumbore S.E., Gleixner G. (2015). Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nat Commun*. 6: 6707.
- Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:5111-5120.
- Likar M., Stres B., Rusjan D., Potisek M., Regvar M. (2017). Ecological and conventional viticulture gives rise to distinct fungal and bacterial microbial communities in vineyard soils. *Appl Soil Ecol*. 113: 86-95.
- Liu J., Sui Y., Yu Z., Shi Y., Chu H., Jin J., Liu X., Wang G. (2014). High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China. *Soil Biology & Biochemistry*. 70: 113-122.
- Lundberg D.S., Lebeis S.L., Paredes S.H., Yourstone S., Gehring J., Malfatti S., Tremblay J., Engelbrektson A., Kunin V., Del Rio T.G., Edgar R.C., Eickhorst T., Ley R.E., Hugenholtz

- P., Tringe S.G., Dangl J.L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*. 488(7409):86–90.
- Madigan, M., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of microorganisms*. 13th Ed. Pearson Education, Inc, San Francisco, United States of America: 1043.
- Marasco M., Rolli E., Fusi M., Michoud G., Daffonchio D. (2018) Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*. 6:3.
- Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., Crowley D.E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33:1437-1445.
- Martínez G., Márquez J.A., Sánchez E., Mendoza M.R., Valenzuela M.J., Medina G. (2010) Respuesta de cultivares de uva de mesa en diferentes zonas agroecológicas de México. Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Folleto técnico no. 39
- Martínez-Díaz G., Miranda-Blanco, J.L. (2017). Efectos de dosis de cianamida de hidrógeno en brotación y producción de racimos en vid de mesa. *Ciencias Agrícolas*. 8:1667–75.
- Martins G., Lauga B., Miot-Sertier C., Mercier A., Lonvaud A., Soulas M.L., Soulas G., Masneuf-Pomarede I. (2013). Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *PLOS ONE*. (8): e73013 (a)
- Martins G., Miot-Sertier C., Lauga B., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Soulas G., Masneuf-Pomarede I. (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*. 158: 93-100 (b).
- Massart S., De Clercq D., Salmon M., Dickburt C., Jijakli M. (2005). Development of real-time PCR using Minor Groove Binding probe to monitor the biological control agent *Candida oleophila* (strain O). *Journal of Microbiological Methods*. 60: 73-82
- McNear Jr., D. H. (2013) The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4(3):1.
- Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers JM. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Rev.* 37(5): 634-663.
- Mganga K.Z., Razavi B.S., Sanaullah M., Kuzyakov Y. (2019). Phenological stage, plant biomass, and drought stress affect microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of *Enteropogon macrostachyus*. *Pedosphere* 29(2): 259-265.
- Miki T., Yokokawa T., Matsui K. (2014). Biodiversity and multifunctionality in a microbial community: a novel theoretical approach to quantify functional redundancy. *P Roy Soc B-Biol Sci*. 281(1176):20132498
- Montaño K., Preciado J. (2017). La productividad del trabajo en la producción de uva de mesa sonorense. *Transitare*. 3(2): 58-82.
- Morgan H., du Toit M., Setati M. (2017). The Grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*.8.
- Morrison-Whittle P., Lee S.A, Goddard M.R. (2017). Fungal communities are differentially

- affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 246: 306-13.
- Mueller U.G., Sachs J.L. (2015). Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends Microbiol*. 23: 606–617.
- Muñoz-Leoz B., Garbisa C., Antigüedad I., Ruiz-Romera E. (2012). Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem*. 48: 125-134.
- Neal A.L., Ahmad S., Gordon-Weeks R., Ton J. (2012). Benzoxazinoids in Root Exudates of Maize Attract *Pseudomonas putida* to the Rhizosphere. *PLoS ONE* 7(4): e35498.
- Nelson E.B., (2017). The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant Soil*. 422:7-34.
- Nemergut D.R., Schmidt S.K., Fukami T., O’Neill S.P., Bilinski T.M., Stanish L.F., Knelman J.E., Darcy J.L., Lynch R.C., Wickey P., Ferrenberg S. (2013). Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 3 (77): 342-356.
- Nogales B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. 2(14): 41-50
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de hongos y levaduras en alimentos.
- Novello G., Gamalero E., Bona E., Boatti L., Mignone F., Massa N., Cesaro P., Lingua G., Berta G. (2017). The Rhizosphere Bacterial Microbiota of *Vitis Vinifera* Cv. Pinot Noir in an Integrated Pest Management Vineyard. *Frontiers in Microbiology* 8: 1-11.
- O’Donnell A.G., Seasman M., Macrae A., Waite I., Davies J.T. (2001). Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil*. 232:135-145 (b).
- O’Donnell K. (1993). Fusarium and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW, editors. *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford: CAB International. 225-233 (a)
- Orozco-Mosqueda M.C., Rocha-Granados M.A., Glick B.R., Santoyo G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth promoting mechanisms. *Microbiological Research* 208: 25-31.
- Ortíz-Maya J., Escalante-Espinosa E., Fócil-Monterrubio R.L., Ramírez-Saad H.C., Díaz Ramírez I.J. (2017). Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 33 (2): 237-46.
- Pacasa-Quisbert F., Loza-Murguía M.G., Bonifacio-Flores A., VINO-NINA L., Serrano-Canaviri T.

- (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 1(8): 2-25.
- Panke-Buisse K., Poole A.C., Goodrich J.K., Ley R.E., Kao-Kniffin J. (2015). Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME J*. 9:980-989.
- Pedraza R., Katia R., Teixeira A., Baca B., Azcón R., Vera L.D., Bonilla R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*. 11 (2): 155.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., van der Putten W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews | Microbiology*. (11): 789-799.
- Pinto C., Gomes A.C. (2016). *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*. 61(3): 243-56.
- Pire R., Díez J. (2006). El crecimiento de las raíces de vid en la condición de trópico (10° 01' N) de Tarabana, estado Lara, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(4): 459-470.
- Pujol M., Badosa E., Manceau C., Montesinos E. (2006) Assessment of the Environmental fate of the biological control agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and Real-Time PCR methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 4(72): 2421–2427.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 41: 590–596.
- Radic, T., Likar, M., Han, K., Bogdanovi, I., Paskovi, I. (2014). Occurrence of root endophytic fungi in organic versus conventional vineyards on the Croatian coast. *Agric. Ecosyst Environ*. 192, 115-121.
- Ramírez E. y Trujillo N. (2012). La hidrólisis de diacetato de fluoresceína: un método eficaz para determinar la actividad microbiana en muestras de suelo contaminado por pesticidas. *Ciencia y Mar XVI*. 47: 31-36.
- Ramos E., Zúñiga D. (2008). EFECTO de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología aplicada*. 1(7): 123-130.
- Red de Estaciones Meteorológicas Automáticas de Sonora ([www.siafeson.com/remas](http://www.siafeson.com/remas)). CESAVE, SIAFESON, 2014-2017.
- Reinhold-Hurek B., Bunger W., Burbano C.S., Sabale M., Hurek M. (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology*. 53:403-24
- Rolli E., Marasco R., Saderi S., Corretto E., Mapelli F., Cherif A., Borin S., Valenti L., Sorlini C., Daffonchio D. (2017). Root-Associated Bacteria Promote Grapevine Growth: From the Laboratory to the Field.” *Plant and Soil* 410 (1–2): 369–82.
- Romaniuka R., Giuffrea L., Costantinia A., Nannipieri, P. (2011). Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecological Indicators*, 11: 1345-1353.

- Rossouw D., Næs T., Bauer F.F. (2008) Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics*. 9:530.
- Rugova A., Puschenreiter M., Koellensperger G., Hann S. (2017). Elucidating rhizosphere processes by mass spectrometry A review. *Analytica Chimica Acta*. (956): 1-13.
- SAGARPA PAN 2017-2030 Uva mexicana pag 1  
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- Santana-Aragone D., Colina-Navarrete E., Castro-Arteaga C., Cadena-Piedrahita D., Sotomayor-Morán A. (2017). Microorganismos fijadores de nitrógeno y su acción complementaria a la fertilización química en el cultivos de *Coffea arabica* L. *European Scientific Journal*. 3(13): 1857- 7881.
- Sarabia M., Cornejo P., Azcón R., Carreón-Abud Y., Larsen J. (2017). Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rizosphere*. (4): 89-93.
- Sarma B.K., Yadav, S.K., Singh, S., Singh, H.B. (2015). Microbial consortium mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*. 87: 25-33.
- Sasse J., Martinoia E., Northen T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*. 1(23): 25-41.
- Seiber J.N., Coats J., Duke S.O., Gross A.D. (2014). Biopesticides: state of the art and future opportunities. *J. Agric. Food Chem*. 62: 11613-11619.
- Serralde A.M, Ramírez M.M. (2004). Diferentes Tratamientos Agronómicos. *Revista Corpoica*.5: 31-40.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SIAP-SAGARPA). 2017. [http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/enero/Documents/JAC\\_0014-10.PDF](http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/enero/Documents/JAC_0014-10.PDF)
- Stadtman E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Sci*. (80) 257: 1220-1224.
- Sugiyama A., Ueda Y., Zushi T., Takase H., Yazaki K. (2014). Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. *PLoS ONE* 9:e100709.
- Tapia H. (1990). “Detección de bacterias benéficas en suelos con banano (*Musa AAA*, simmonds) cultivar ‘gran enano’ y su potencial para integrar un biofertilizante”. Importancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno. 6(44): 120-145.
- Tejada M., Benítez C., Gómez I., Parrado J. (2011). Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology*. 49:11–17.
- Torres A., Omaña J.M., Chalita L.E., Valdivia R., Morales J. (2014). Análisis de rentabilidad y distribución de la uva de mesa de Hermosillo Sonora en EE y la UE. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 35(8): 1365-1376.
- Torsvik V. R. Sørheim y J. Goksoyr. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities- A review. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 17(3-4): 170-178.

- Trouvelot S., Bonneau L., Redecker D., Van Tuinen D., Adrian M., Wipf D. (2015). Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 1449-1467.
- Vale M., Nguyen C., Dambrine E., Dupouey J.L. (2005). Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 37: 2329-2333.
- Vallejo-Quintero V.E. (2013). Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano: experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colombia Forestal*.16,1,83-99
- Vandenkoornhuyse P., Quaiser A., Duhamel M., Le van A., Dufresne A. (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* 4:1-11.
- Vázquez M. B., Amodeo M. R., Bianchinotti M. V. (2016). Estimación de la biomasa fúngica en un suelo del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina) con una tinción directa con blanco de calcoflúor. *Revista Argentina de Microbiología.* 48(3): 252-258 (a).
- Vázquez V.N. (2011). Asociación agrícola de productores de uva de mesa, modelo de la agricultura moderna en México en el siglo XXI. *Fundación Produce Sonora, A. C.* 92 (b)
- Vega-Avila A. D., Gumiere T., Andrade P.A.M, Lima-Perim J.E., Durrer A., Baigori M., Vazquez F., Andreote F.D. (2015). Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina.” *Antonie van Leeuwenhoek* 107 (2): 575-88.
- Wang L., 1, Xia J., Zhang W., Wang J., Zhu L., Wang J., Wei Z., Ahmad Z. (2019). Separate and joint eco-toxicological effects of sulfadimidine and copper on soil microbial biomasses and ammoxidation microorganisms abundances. *Chemosphere* 228: 556-564 (a).
- Wang X., Zhang W., Shao Y., Zhao J., Zhou L., Zou X., Fu S. (2019). Fungi to bacteria ratio: Historical misinterpretations and potential implications. *Acta Oecologica.* 95: 1-11 (b)
- West E., Cother E., Steel C., Ash G. (2010). The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can J Microbiol.* 56:209-216.
- White R. (2009). Where the vine roots live. *Understanding Vineyard Soil.* University Press Oxford. 99-185.
- Wilschut R.A., van der Putten W.H., Garbeva P., Harkes P., Konings W., Kulkarni P., Martens H., Geisen S. (2019). Root traits and belowground herbivores relate to plant–soil feedback variation among congeners. *Nature Communications.* 1564(10).
- Wooley J.C., Ye Y. (2010). Metagenomics: facts and artifacts, and computational challenges. *J Comput Sci Technol.* 25(1):71-81.
- Wu Y., Feng N., Pare Y.L., Chen P.W., Xu Y.L., Wu R., Wang S., Zhao S.M., Li Q., Wang H.R, Zhang J.L. (2016). Beneficial soil microbe promotes seed germination, plant growth and photosynthesis in herbal crop *Codonopsis pilosula*. *Crop Pasture Sci.* 67:91-98.
- Xu J., Liu S., Song S., Guo H., Tang J., Yong J.W.H, Ma Y., Chen X. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition and the associated soil microbial community under different soil phosphorus availability. *soil biology and biochemistry.* 12(866):181-190. (a).

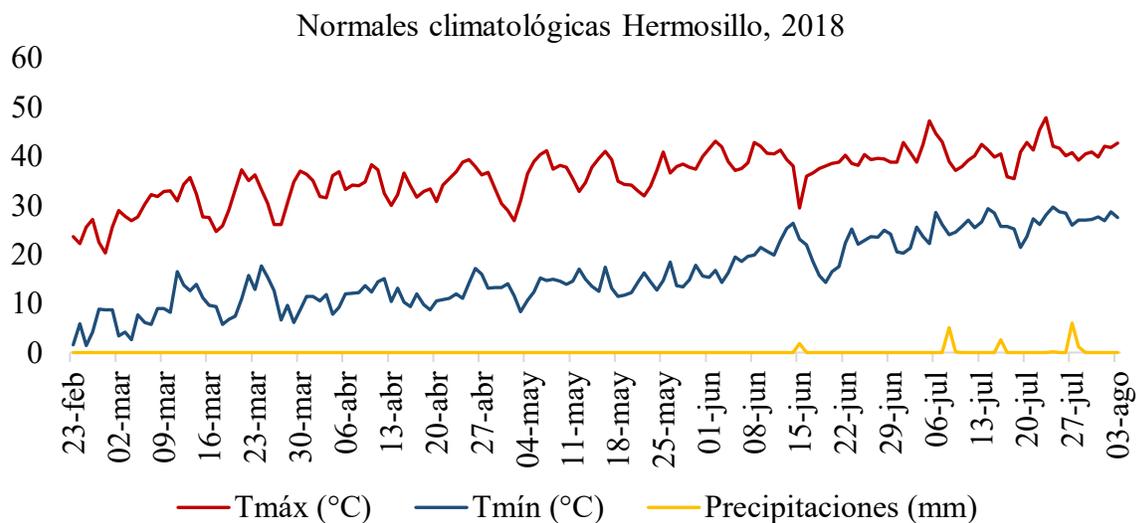
- Xu L., Naylor D., Donga Z., Simmons T., Pierroza G., Hixson K.K., Young-Mo K., Zink E.M., Engbrecht K.M, Wang Y., Gao Ch., DeGraaf S., Madera M.A., Sieverte J.A., Hollingsworthe J., Birdseye D., Schellera J.V., Hutmacherg R., Dahlberge J., Jansson Ch., Taylor J.W., Lemaux P.G., Coleman-Derra D. (2018) Drought delays development of the sorghum root microbiome and enriches for monoderm bacteria. PNAS. 21 (115): 4284-4293. (b).
- Yu-Meng Ch., Fo-Ting S., Shih-Chao Ch., Chun-Mei C. (2018) Functional diversity and dominant populations of bacteria in banana plantation soils as influenced by long-term organic and conventional farming. Applied Soil Ecology. (10): 21-33.
- Zarraonaindia I., Owens S.M., Weisenhorn P., West K., Hampton-Marcell J., Lax S. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. MBio. 6(2): 1-10.
- Zhang X., Zhang Y., Sha L., Wu Ch., Tan z., Song Q., Liu Y., Dong L. (2015). Effects of continuous drought stress on soil respiration in a tropical rainforest in southwest China. Plant Soil. (394): 343-353.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1a.** Variables climatológicas de Hermosillo, Sonora correspondientes a los días de las tomas de muestras.

Zona: Costa de Hermosillo	
Municipio: Hermosillo, Sonora	
Referencia: Kino	
Fecha: 23/02/18 (Brotación)	Fecha: 3/08/18 (Poscosecha)
Tmáx: 21.8°C	Tmáx:38.6
Tmín: 3.7	Tmín:28.0
Precipitaciones acumuladas (mes): 3.30 mm	Precipitaciones acumuladas (mes):107.8 mm

**Anexo 1b.** Gráfico del comportamiento de las variables climatológicas durante el período de estudio (23/02/18 hasta 3/08/18). Temperatura máxima (rojo), temperatura mínima (azul) y frecuencia de precipitaciones (amarillo). Red de Estaciones Meteorológicas Automáticas de Sonora



([www.siafeson.com/remas](http://www.siafeson.com/remas)) CESAVE, SIAFESON, 2014-2017.

**Anexo 2.** Fertilización de uva de mesa kg/ha. Agenda técnica agrícola de Sonora, 2015

Época	N	P	K	Ca	Mg
Poda-Brotación	0	0	0	0	0
Brotación-Floración	30	30	30	0	0
Floración-envero	60-80	30	40	0	15

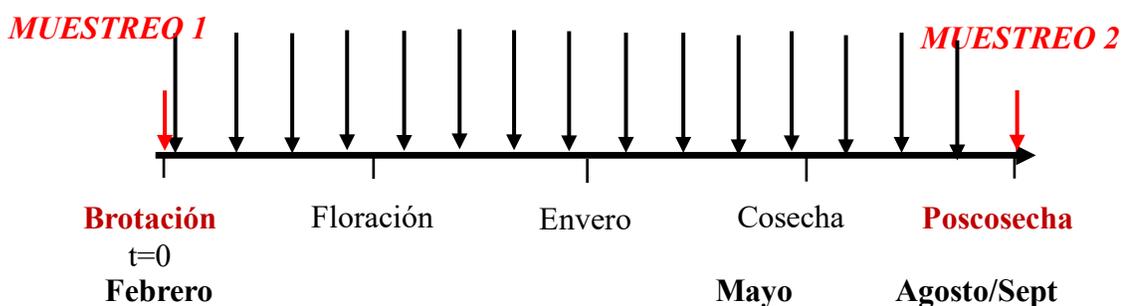
Envero-cosecha	10-20	10	50	25	10
Cosecha-caída de las hojas	20-50	30	20	0	0
Caída de las hojas -poda	0	0	0	0	0

**K:**  $K_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $KNO_3$ . **Ca:** Yeso. **Mg:**  $MgSO_4$ . **N:**  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KNO_3$ ,  $Ca(NO_3)_2$ . **P:**  $H_3PO_4$ ,  $NH_4H_2PO_4$ ,  $KH_2PO_4$ .

**Principales productos utilizados a partir de la brotación de la vid para el control de enfermedades.**

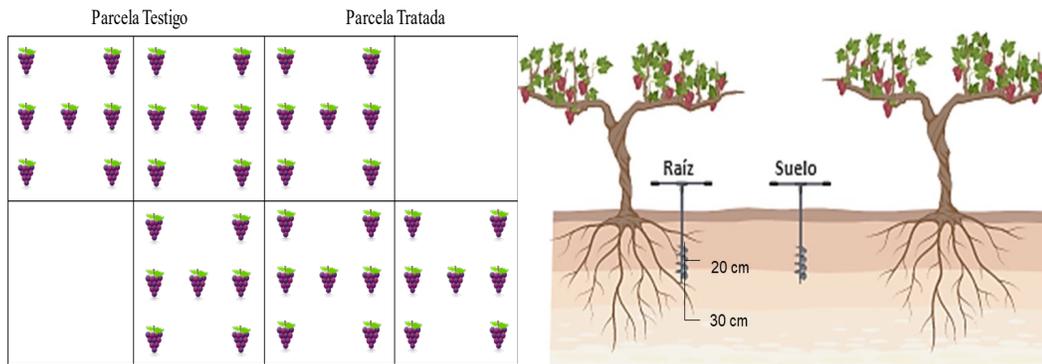
- a. Control de enfermedades foliares causadas (Cenicilla y Mildiu de la vid): 5 aplicaciones de azufre, 3 aplicaciones de  $Cu(OH)_2$ , 2 de myclobutanil, 1 de pirclostrobyn + boscalid.
- b. Insecticidas: Imidacloprid, Betacyflutri, Spinosad, Entrust, Exaltno
- c. Fungicidas: Cobre, Mancozeb, Benomyl, Azoxistrobin
- d. Herbicidas: Glifosato, Sethoxydim, Fluzifop-butyl
- e. Nematicidas: Fenamifos, Namacur, Nematrol

**Anexo 3.** Representación esquemática del ciclo fenológico de la vid. Toma de muestras (flechas rojas) en brotación y poscosecha. Aplicaciones de los bioestimulantes (flechas negras).



**Anexo 4** a) Diseño de muestreo n=3, b) Representación esquemática de la profundidad de toma de muestras en suelo y raíces de vid.

**Anexo 5**



Análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA). Diferencias ( $p < 0.05$ ) entre los metagenomas de cada muestra: suelo no rizosférico, rizosfera y rizoplano. En la tabla sólo se muestran las comparaciones significativas.

Variable	Grupos	Pseudo f-statistic	p-value
Tipo	I_Suelo, I_Rizosfera , I_Rizoplano, II_Suelo testigo, II_Suelo tratado, II_Rizosfera testigo, II_Rizosfera tratado, II_Rizoplano testigo, II_Rizoplano tratado	4.23133	0.00001

Grupo1	Grupo2	Pseudo f-statistic	p-value
Suelo I	Rizosfera I	8.9416	0.002
Suelo I	Rizoplano I	8.4063	0.002
Suelo I	Suelo C_II	3.7749	0.01
Suelo I	Suelo T_II	4.0732	0.03
Suelo I	Rizosfera C_II	6.429	0.01
Suelo I	Rizosfera T_II	6.6996	0.01
Suelo I	Rizoplano C_II	7.3766	0.01
Suelo I	Rizoplano T_II	6.477	0.01
Rizosfera I	Rizoplano I	1.8641	0.03
Rizosfera I	Suelo C_II	3.9776	0.01
Rizosfera I	Suelo T_II	4.8654	0.03
Rizosfera I	Rizosfera C_II	5.2303	0.01
Rizosfera I	Rizosfera T_II	4.6614	0.01
Rizosfera I	Rizoplano C_II	4.5581	0.01
Rizosfera I	Rizoplano T_II	3.0208	0.01
Rizoplano I	Suelo C_II	4.0444	0.01
Rizoplano I	Suelo T_II	4.9694	0.03
Rizoplano I	Rizosfera C_II	5.1018	0.01
Rizoplano I	Rizosfera T_II	4.5147	0.01
Rizoplano I	Rizoplano C_II	3.7059	0.01
Rizoplano I	Rizoplano T_II	2.6587	0.01

**Anexo 6.** Grupos taxonómicos presentes en suelo, rizosfera y rizoplano de *Vitis* vinífera var. Flame, con una abundancia >1%, agrupados según las dos etapas fenológicas del cultivo que fueron muestreadas.

<b>REINO</b>	<b>FILO</b>	<b>CLASE</b>	<b>ORDEN</b>	<b>FAMILIA</b>	<b>GÉNERO</b>	
<b>BACTERIA</b> 87%	Proteobacteria 32%	Alphaproteobacteria 64%	Rhizobiales 84%	Rhizobiaceae 31%	Allorhizobium-Neorhizobium 77%	
				Rhizobiales 11%	Bauldia 59%	
	Firmicutes 28%	Bacilli 100%	Betaproteobacteria 30%	Pseudomonadales 42%	Rhodomicriaceae 4%	Rhodomicrobium 100%
					Xanthobacteraceae 24%	
					Devosiaceae 7%	Devosia 76%
					Hyphomicrobiaceae 14%	Pedomicrobium 83%
					Burkholderiaceae 83%	Massilia 57%
					Steroidobacteriales 14%	Steroidobacter 63%
					Pseudomonaceae 100%	Pseudomonas 100%
					Steroidobacteraceae 100%	
					Bacilliales 100%	Bacillus 99%
					Bacilliales 100%	Planomicrobium 77%
	Actinobacteria 22%	Actinobacteria 73%	Corynebacteriales 28%	Planococcaceae 56%	Planococcus 13%	
				Mycobacteriaceae 97%	Mycobacterium 100%	
				Micrococcales 29%	Arthrobacter 71%	
Micrococcales 29%				Pseudoarthrobacter 24%		
Micromonosporales 17%				Actinoplanes 71%		
Micromonosporaceae 100%						
Planctomycetes 4%	Planctomycetacia 94%	Pirellulales 70%	Streptomycetales 8%	Streptomyces 98%		
			Streptomycetaceae 100%			
			Pirellulaceae 100%			

<b>REINO</b>	<b>FILO</b>	<b>CLASE</b>	<b>ORDEN</b>	<b>FAMILIA</b>	<b>GÉNERO</b>					
<b>BACTERIA</b> 83%	Proteobacteria 36%	Alphaproteobacteria 62%	Rhizobiales 78%	Hypomicrobiaceae 16%	Pedomicrobium 78%					
				Rhizobiaceae 29%	Allorhizobium- Neorhizobium-Rhizobium 77%					
	Gammaproteobacteria 30%				Rhodmichiaceae 4%	Rhodmichium 100%				
					Sphingomonadales 7%	Sphingomonadaceae 100%	Shingomonas 44%			
							Novosphingobium 26%			
					Aeromonadales 6%	Aeromonadaceae 100%	Aeromonas 100%			
					Betaproteobacteriales 30%	Burkholderiaceae 49%	Variovorax 31%			
					Gammaproteobacteria 30%	100%	Acidibacter 99%			
					Pseudomonadales 31%	Pseudomonaceae 100%	Pseudomonas 100%			
					Steroidobacteriales 12%	Steroidobacteraceae 100%	Steroidobacter 59%			
					Actinobacteria 26%	Acidimicrobia 12%				
									Actinobacteria 68%	Corynebacteriales 12%
		Frankiales 7%	Geodermatophilaceae 85%	Geodermatophilus 72%						
		Micrococcales 19%	Micrococcaceae 77%	Arthrobacter 57%						
		Micromonosporales 28%	Micromonosporaceae 100%	Actinoplanes 45%						
		Propionibacteriales 10%	Nocardioideaceae 94%	Nocardioides 49%						
		Pseudonocardiales 7%	Pseudonocardiaceae 100%	Pseudonocardia 75%						
		Streptomycetales 11%	Streptomycetaceae 100%	Streptomyces 91%						
	Acidobacteria 7%									
	Firmicutes 8%	Bacilli 99%	Bacilliales 100%	Bacillaceae 72%					Bacillus 91%	
	Bacteroidetes 3%	Bacteroidia 98%	Chitinophagales 53%	Chitinophagaceae 95%	Chitinophaga 48%					
Nitrospirae 1%	Nitrospira 100%	Nitrospirales 100%	Nitrospiraceae 100%	Nitrospira 100%						

**Anexo 7.** Tabla de abundancia relativa de los géneros presentes en suelo, rizosfera y rizopiano de *Vitis vinifera*, en las dos etapas fenológicas del cultivo: I: Brotación, II: Poscosecha.

