



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

El microbioma del agroecosistema y su importancia
en la agricultura sostenible.

Marc Carrasquilla Gallego

Dirigida por:

Dra. Núria Gaju Ricart y Dra. Maira Martínez-Alonso

Diciembre, 2020

El microbioma del agroecosistema y su importancia
en la agricultura sostenible.

Memoria presentada para optar al grado de doctor en Microbiología por la Universitat
Autònoma de Barcelona por

Marc Carrasquilla Gallego

Con la aprobación de sus directoras,

Dra. Núria Gaju Ricart

Dra. Maira Martínez-Alonso

Bellaterra, diciembre de 2020

“Huele a pino el coche

Y el mar a gasolina”

Ismael Serrano

“El desconocimiento —sonrió Regis—, no constituye justificación para acciones irreflexivas.

Si no se sabe, cuando se tienen dudas, lo mejor es pedir consejo...”

Andrzej Sapkowski

Resumen

Las plantas establecen interacciones con multitud de microorganismos que influyen en su desarrollo y supervivencia, de manera que estas podrían ser consideradas como metaorganismos, la planta depende de su microbiota para obtener nutrientes y como escudo contra enfermedades, entre otros, y a cambio, la planta le proporciona nutrientes en forma de exudados que pueden representar hasta un 21% del carbono que fija fotosintéticamente. Dichas interacciones, tanto con la microbiota de la filosfera como la de la rizosfera, son cruciales para la salud de las plantas, su adaptación al estrés biótico y abiótico, así como un elemento básico para conseguir una agricultura sostenible.

En este estudio se ha caracterizado la microbiota bacteriana y fúngica asociada a la filosfera de dos árboles frutales, *Malus domestica* y *Pyrus communis*, a lo largo de su desarrollo fenológico, mediante tres aproximaciones moleculares diferentes. Los resultados obtenidos son equivalentes para las tres metodologías en cuanto a la composición taxonómica de las comunidades microbianas. Se ha definido el core del microbioma para ambas especies vegetales. Dentro de este, cabe resaltar la presencia de género *Deinococcus* en el core del bacterioma, a diferencia de estudios previos y se ha descrito por primera vez el core del micobioma de la filosfera. Se han establecido dos modelos para explicar la sucesión microbiana a lo largo del ciclo vegetativo del árbol, así como biomarcadores representativos para cada uno de ellos.

Por otro lado, se ha descrito el microbioma de la rizosfera de suelos conductivos y supresivos para el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne spp.*, observándose marcadas diferencias entre ellos. Se ha caracterizado el core, destacando la presencia de *Sporosarcina*, *Pseudombrophila*, Chaetomaiaceae, *Cladosporium* y Morteriellaceae, como característicos en suelos supresivos. Respecto a los biomarcadores indicativos de la condición de supresividad se han identificado los siguientes taxones, Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, *Cladosporium*, *Pyrenochaeta*, *Arachniotus*, *Pseudogymnoascus*, *Pseudombrophila* y *Morteriella*.

Finalmente, se realizó unos ensayos en maceta para valorar el impacto del agente de biocontrol contra *Meloidogyne incognita*, *Trichoderma asperellum*, sobre la microbiota de la rizosfera de *Solanum lycopersicum*, donde además se tenían en cuenta dos variables, la tipología del suelo supresivo y la variedad vegetal (resistente o sensible al patógeno). Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que los factores determinantes en la composición taxonómica de la microbiota del suelo rizosferico son en orden decreciente de importancia, la tipología del suelo y la variedad vegetal. No se ha podido valorar el efecto de *Trichoderma asperellum* dada la falta de prevalencia de este agente de biocontrol en el suelo.

Abstract

Plants establish interactions with a multitude of microorganisms that influence their development and survival, so that these could be considered as meta-organisms, the plant depends on its microbiota to obtain nutrients and as a shield against diseases, among others, and in return, the plant provides it with nutrients as exudates, that can represent up to 21% of the carbon it fixes photosynthetically. Such interactions, both with the phyllosphere and rhizosphere microbiota, are crucial for the health of plants, their adaptation to biotic and abiotic stresses, as well as a basic element for achieving sustainable agriculture.

In this study, the bacterial and fungal microbiota associated with the phyllosphere of two fruit trees, *Malus domestica* and *Pyrus communis*, have been characterized throughout their phenological development, using three different molecular approaches. The results obtained are equivalent for the three methodologies regarding the taxonomic composition of the microbial communities. The core of the microbiome has been defined for both plant species. Within this, it is worth to highlight the presence of the genus *Deinococcus* in the core of the bacteriome, unlike previous studies and the core of the mycobiome of the phyllosphere has been described for the first time. Two models have been established to explain the microbial succession along the vegetative cycle of the tree, as well as representative biomarkers for each of them.

On the other hand, the rhizosphere microbiome of conductive and suppressive soils has been described for the phytopathogenic nematode *Meloidogyne spp.*, observing marked differences between them. The core has been characterized, highlighting the presence of *Sporosarcina*, *Pseudombrophila*, Chaetomaiaceae, *Cladosporium* and Morteriellaceae, as characteristic in suppressive soils. Regarding the biomarkers indicative of the suppressive condition, the following taxa have been identified: Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, *Cladosporium*, Pyrenochaeta, *Arachniotus*, *Pseudogymnoascus*, *Pseudombrophila* and *Morteriella*.

Finally, a pot assay was carried out to assess the impact of the biocontrol agent against *Meloidogyne incognita*, *Trichoderma asperellum*, on the microbiota of the rhizosphere of *Solanum lycopersicum*, where two variables were also considered, the type of suppressive soil and the variety plant (resistant or sensitive to the pathogen). The results obtained have shown that the determining factors in the taxonomic composition of the rhizospheric soil microbiota are, in decreasing order of importance, the typology of the soil and the vegetable variety. The effect of *Trichoderma asperellum* could not be evaluated given the lack of prevalence of this biocontrol agent in the soil.

Acknowledgements

El trayecto de doctorando está acabando, y es el momento de agradecer a todos los que me han acompañado este tiempo. Y no puedo empezar estos agradecimientos de otra manera, que con mis padres. Por todo. Por haberme ayudado a hacer realidad lo que desde pequeño había querido ser “un científico loco”. En serio, por todo, por el apoyo, por ponerme la vida tan fácil, en general, y por hacer mis estudios llevaderos en particular, por venirse conmigo al RockFest, por las vacaciones juntos, por el café, por estar ayudando ya antes de que lo pida... GRACIAS. Y esto se extiende al resto de la familia, en especial al yayo, que siempre cultivó mi curiosidad, y mi capacidad de observación, cosa que luego me ha ayudado en mi travesía como investigador. I com a part especial d'aquesta família que em anat formant, a Merit, per recolzarme, per comprendre les meves nits de desvetllament, per venir a despertar-me després d'aquesta forma tan dolça, per deixar-me ser jo amb tu, per la teva afinada forma de cantar, pel viatge a Costa Rica que mai oblidarem, en definitiva, per estar aquí i fer aquest pas per la una miqueta més divertit.

También agradecer a todos los compañeros que han aparecido durante las diferentes etapas de mi formación, de forma mas o menos efímera, y sobre todo a los que se han quedado. A ese pequeño y extraño grupo del consejo de sabios de telegram y en especial al MTG group, esas personas sin las que ahora mismo la vida se me haría muy extraña y difícil, esas personas con las que pienso seguir jugando toda mi vida, a magic o a lo que sea, es lo de menos, es la excusa para vernos. Por esos viernes de FNM+birra+ramen o hamburguesa+comando paki. A Marc, mi amigo, la persona con la que posiblemente más tiempo he estado en los últimos 15 años, y la persona con la que quiero seguir compartiendo miles de cosas en común TODOS los años más; esa persona que me debe haber enganchado unas 200 frases inútiles, pero con las que cualquier momento, es un momento mas divertido xD. Marcos, mi Mincs, mi Regis, mi Casillas, mi Gimli, mi Sten, mi Wrex, porqué sigamos descubriendo mundos juntos. A Samir y Germán, por vuestro humor tan especial, por seguir riéndome con vosotros de la gente que no ha entendido de que va esto de la vida.

Como pasar 10 años en la universidad, a un buen rato de casa, recibiendo clases, estudiando y luego con el doctorado?? Pues eso no hubiera sido posible sin el bar, y sin las pausas para comer, empezando cuando estudiábamos, por las mesas de 20 o 30 personas en la cívica, en la que no sabías ni quien había en el otro lado de la mesa, de lo largas que eran, y siguiendo por el grupito que fuimos formando durante el doctorado. Esos descansos llenos de política, series, pelis y, sobre todo, juegos. MUCHOS JUEGOS. Jofre, friky, el niño, Juanmi, Gerard, Chefo, Pablo, Javi... En especial a Elia, por que en el momento en el que más necesitaba airearme estuviste ahí; a Olivia, una muy buena amiga, muchas charlas, mucha política, muchos buenos ratos, y no menos importante, la propietaria de la mitad de casi todo el material audiovisual que veo. Y el portador y creador de muchos juegos, Eloi, pero a él iremos más adelante.

Y como no, todos los compañeros que han ido pasando por la planta 4 de C3. Començant per la Marta, que em va ensenyar el valor del temps i la organització. En Martí i les nostres xarres sobre política. Al Marc Llorós i la seva introducció a la bioinformàtica. A mis esclavos, Edu, David, Pau, la sempre somrient, amable, simpàtica i treballadora Justa, i a l'Eloi; l'esclau que va trencar les cadenes, i que va esdevindre en un gran amic, et trobo a faltar, treballar amb tu va ser molt fàcil, tant de bo això es torni a donar. Tambien por la vida que hemos podido ir encontrando al otro lado del pasillo y en el otro piso, a pesar de todo, algo de vida hemos podido encontrar, Eli (la locuela o a quien le paso todas las cosas que encuentro de Harry Potter), Oihane, Jordi, el Colom, Marta... Mención especial, claro a Miquel, ese jovencito con corazón de señor mayor, con quien me desahogo cuando el Barça la lía, en quien pienso cuando estreno una camiseta, y quien me debe una cena en su piso nuevo (lo pongo aquí, a ver si hace presión). También mención especial del otro lado del pasillo a Jennifer y nuestras vueltas de fiesta a casa en el bus infernal.

Pero al laboratorio llegué por Tamara (Mara, von Entropy depende del rato...), por pedirme que me apuntara a ayudarte en unas prácticas y que ello acabara en conocer a mis dos ángeles de la guardia científica, Núria y Maira, que em van donar l'oportunitat de ser el que sempre havia volgut ser, quan pensaba que ja mai pasaría, per rascar de sota les pedres per donar-me una oportunitat. Joder, muchas gracias. Mai oblidaré el dia en el que em veu dir que volieu comptar amb mi, al despatx, recordó que no podía contenir les llàgrimes. I no només això, després m'heu ajudat en tot. Tampoc oblidaré mai el dia de les colònies blaves T_T. Per aquestes llargues xerrades, per aquest "vaig a Ca la Maira" y estar fins les tantes, perquè al despatx de la maira es sap quan s'entra, però mai quan es surt. I clar, per ajudarme a fer que aquesta tesis doctoral sigui quelcom del que em pugui sentir orgullós.

Abreviaturas

Amova: Analysis of molecular variance / Análisis de la varianza molecular

APS: Ammonium Persulfate / Persulfato de amonio

CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide / Bromuro de cetiltrimetilamonio

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electroforesis / Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido etilendiaminotetraacético

FAPROTAX: Functional Annotation of Prokaryotic Taxa / Anotación funcional de taxón procariota

Homova: Homogeneity of molecular variance / Análisis de la homogeneidad de la varianza molecular

HR: Humedad relativa

IRTA: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries / Instituto de investigación y tecnología agroalimentarias

ITS: Internal Transcribed Spacer / Espaciador del transcrito interno

LEfSe: Linear discriminant analysis Effect Size / Análisis discriminante lineal del efecto del tamaño

NMDS: Non-metric multidimensional scaling / Escalamiento no métrico multidimensional

OTU: Operational Taxonomic Unit / Unidad Taxonómica Operativa

PCR: Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria / Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

RKN: Root-Knot Nematodes / Nematodos nuduladores de raíz

TAE: Tris Acetate EDTA / Tris acetato EDTA

TBE: Tris Borate EDTA / Tris borato EDTA

TEMED: Tetramethylethylenediamine / Tetrametiletilendiamina

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with arithmetic mean / Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética

Índice

Capítulo 1. Introducción	20
1.1 El agroecosistema	21
1.2 Las interacciones entre la planta y la microbiota asociada	24
1.2.1 La filosfera	25
1.2.2 La rizosfera	29
1.3 Técnicas moleculares aplicadas al estudio del microbioma del agroecosistema	33
Capítulo 2. Objetivos	35
Capítulo 3. Material y métodos	37
3.1 Zonas de muestreo	39
3.1.1 Finca experimental de <i>la Fundació Mas Badia – IRTA</i>	39
3.1.2 <i>Fornells de la Selva</i>	41
3.1.3 <i>Alcanar</i>	43
3.1.4 <i>Amposta</i>	44
3.1.5 <i>Cabrera de Mar</i>	45
3.2 Recogida, transporte y procesamiento de las muestras	47
3.2.1 Recogida de muestras de la filosfera	47
3.2.2 Recogida de las muestras de suelo	50
3.2.3 Extracción de la microbiota de la filosfera	51
3.3 Técnicas moleculares	52
3.3.1 Extracción DNA	52

3.3.2	Amplificación mediante PCR	53
3.3.3	Cuantificación, concentración y purificación del DNA amplificado	56
3.3.4	Análisis mediante DGGE	57
3.3.5	Análisis mediante genotecas	59
3.3.6	Secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq	60
3.4	Tratamiento bioinformático de los datos	61
3.4.1	Análisis de los perfiles de DNA obtenidos mediante DGGE	61
3.4.2	Análisis de las secuencias	62
3.4.3	Procesamiento de las secuencias obtenidas a partir de las Genotecas	62
3.4.4	Procesamiento de las secuencias obtenidas mediante Illumina MiSeq	64
3.4.5	Estudios de β -diversidad	66
3.4.6	Herramientas utilizadas para la confección de gráficas	67
Capítulo 4. El microbioma de la filosfera de peral y manzano:		
variaciones a lo largo del desarrollo fenológico del árbol		68
4.1	Resultados	69
4.1.1	Estudio de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol mediante DGGE	69
4.1.2	Estudio de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol mediante la confección de genotecas	75

4.1.3	Estudio de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol mediante secuenciación masiva: Illumina MiSeq	85
4.2	Discusión	101
4.2.1	Análisis comparativo de tres metodologías moleculares utilizadas para el estudio de la diversidad microbiana de la filosfera	101
4.2.2	El core de la filosfera de árboles frutales de pepita	106
4.2.3	Cambios en la estructura de la comunidad microbiana de la filosfera de árboles frutales de pepita a lo largo de su ciclo fenológico	108

Capítulo 5. Caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica

	de distintos suelos supresivos y conductivos frente a <i>Meloidogyne spp</i>	113
5.1	Resultados	115
5.1.1	Características físico-químicas y capacidad supresiva de los diferentes suelos estudiados	115
5.1.2	Análisis de la diversidad microbiana de los distintos suelos infestados con <i>Meloidogyne spp</i>	117
5.1.3	Análisis estadístico de las muestras de obtenidas mediante Illumina MiSeq: Beta Diversidad	140
5.2	Discusión	145

Capítulo 6. Impacto de la inoculación de <i>Trichoderma asperellum</i>, agente de biocontrol contra <i>Meloidogyne incognita</i>, sobre el microbioma de la rizosfera de <i>Solanum lycopersicum</i>	151
6.1 Resultados	154
6.1.1 Índices de diversidad y grupos taxonómicos dominantes	154
6.1.2 Análisis de la β -diversidad del microbioma rizosferico de las diferentes condiciones ensayadas	168
6.1.3 Análisis del efecto de la inoculación de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre la microbiota del suelo	184
6.2 Discusión	190
Capítulo 7. Discusión general	197
Capítulo 8. Conclusiones	205
9. Bibliografía	206
10. Anexos	238
10.1 Anexo suplementario capítulo 3	239
10.2 Anexo suplementario capítulo 4	242
10.3 Anexo suplementario capítulo 5	270
10.4 Anexo suplementario capítulo 6	284

Capítulo 1. Introducción

El agroecosistema

Desde que la humanidad comenzó su andadura sedentaria la agricultura ha representado un factor de destrucción de los ecosistemas forestales y la ecosfera en general. No obstante, los árboles son componentes importantes de los agroecosistemas, y proveen de una gran variedad de productos básicos a nivel alimentario y económicamente relevantes. Aproximadamente un 40% de la superficie terrestre está destinada a campos de cultivo y pastos¹. La necesidad de alimentar a una población humana en continuo crecimiento, obliga a un incremento de la producción agrícola^{2,3}. A nivel mundial, el consumo de agua con fines agrícolas es del 70% del total de agua dulce utilizada⁴, además, la utilización de grandes zonas forestales para usos agrícolas está ocasionando una gran pérdida de la biodiversidad⁵. Por ello, cada vez hay más voces que promueven devolver la mitad del área de tierra bajo manejo antropogénico a la cobertura natural del suelo para disminuir las pérdidas de biodiversidad y combatir otros perjuicios del uso antropogénico del suelo⁶. Por lo tanto, la capacidad de producción agrícola y su eficiencia son factores importantes para la sustentar a la humanidad. Folberth asegura que con la debida optimización de los cultivos se podría reducir a la mitad la tierra utilizada para estos fines, manteniendo la producción actual⁷. Pero no solo es un problema de superficie cultivada, ya que para aumentar la eficiencia y la biomasa de las plantas cultivadas además es necesario utilizar una cantidad ingente de fertilizantes. Se estima que a nivel mundial se utilizan unos 10¹¹ kg de fertilizantes nitrogenados al año^{8,9}, de los cuales aproximadamente entre el 50 y el 60% no es absorbido por la planta y provoca alteraciones de la red trófica, además una parte importante se infiltra a las aguas subterráneas y migra al mar donde afecta a toda la cadena alimenticia marina¹⁰.

La agricultura es un sector importante de la economía mundial y concretamente de la española. Según el ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno español, la producción agrícola estatal en 2018 alcanzó los 32.000 millones de euros, lo que representa un 2,7% del PIB solo en economía directa, con una superficie cultivada de 23,2 millones de hectáreas¹¹. Hay que tener en cuenta que es un sector que está

estrechamente relacionado con los ecosistemas naturales por lo que los cambios globales, afectan a la producción agrícola y la economía de los agricultores. El calentamiento global es un hecho científico, en el IPCC 2018 (*The Intergovernmental Panel on Climate Change*) ya se categorizaba el aumento de temperatura en 1,5°C por encima de los niveles pre-industriales¹², esto hace que haya enfermedades que hayan modificado su distribución y en el caso de las vegetales, que se hayan expandido a lugares dónde no eran endémicas¹³. Además del clima, las prácticas agrícolas, el uso de la tierra y el movimiento intercomunitario de las plantas y frutas¹⁴, así como de las personas también son impulsores de la expansión y homogeneización de las enfermedades agrícolas¹⁵. Éstas han perjudicado a los agricultores desde el principio de la civilización¹⁶, pero este proceso de homogeneización de la biota a nivel global, además de ir en detrimento de la biodiversidad, es un problema desde el punto de vista de la sanidad alimentaria y de la resiliencia de las comunidades¹⁷, y ésta expansión la están liderando los patógenos fúngicos¹⁸. No obstante, las especies cultivadas han sido seleccionadas mayormente en función de la producción, dejando en un segundo plano la resistencia a las enfermedades¹⁹. Todos estos factores explican que según la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) alrededor de un 40% de los cultivos se pierden debido a las enfermedades vegetales y a las plagas²⁰.

Las interacciones que se establecen entre las diferentes especies de organismos y los árboles son diversas, y abarcan desde simbiosis hasta alimentación e infección. Cuando esta relación es perjudicial para la especie vegetal y reduce su valor añadido se habla de enfermedades y plagas²¹. La severidad de la enfermedad en una planta no siempre es igual, y viene determinada por el triángulo de la enfermedad, un término que acuñó George McNew en 1960²². McNew sugirió que el triángulo se podría usar para estudiar la interrelación de varios factores en una epidemia y comprender como se puede predecir, limitar o controlar. Esta herramienta entrelaza los tres participantes para el desarrollo y resultado de una enfermedad: huésped, patógeno y medio ambiente. En este triángulo se tienen en cuenta 6 factores que interactúan para determinar el potencial del huésped para desarrollar diversos niveles de enfermedad. Estos factores

son: la severidad del entorno físico (por ejemplo, temperatura, humedad o lluvia), la duración del período de infección, la prevalencia del patógeno, la virulencia del patógeno, la edad o madurez de la planta huésped y su susceptibilidad inherente a la enfermedad. Tradicionalmente, las plagas y enfermedades vegetales se han tratado con biocidas^{23,24}. Por ejemplo, la estreptomomicina y la oxitetraciclina se han utilizado habitualmente para proteger los manzanos y los perales, así como otras Rosaceae de *Erwinia amylovora*^{25,26}, el principal causante del fuego bacteriano, una grave enfermedad que afecta a los árboles frutales de pepita^{27,28}. Precisamente estos son los árboles en los que se ha realizado el estudio de la microbiota de la filosfera a lo largo de su ciclo fenológico. La aplicación de estos productos causa problemas medioambientales^{29,30} y de salud humana³¹, por lo que los estados y las agencias medioambientales están promoviendo un uso más racional de los mismos basado en estudios de campo^{32,33}.

No obstante, la relación que establecen los microorganismos con las plantas no siempre es perjudicial. Hay microorganismos comensales e incluso microorganismos que son beneficiosos para el desarrollo vegetal como, por ejemplo, las bacterias rizosféricas que promueven el crecimiento de la planta (PGPR) que detallaremos más adelante. Por ello, el conocimiento de los microorganismos presentes en la filosfera y la rizosfera de las plantas puede proporcionarnos una información clave para poder abordar diferentes retos desde otra perspectiva, como por ejemplo:

- El conocimiento de las condiciones más propicias para la aparición de una enfermedad (estación, estadio fenológico, condiciones climáticas...) permitirá establecer modelos de predicción epidemiológica robustos como herramienta de control integrado de enfermedades que permitirán tratar la planta, ya sea químicamente o biológicamente, durante una ventana temporal más estrecha³⁴.
- La potenciación de ciertos microorganismos ya existentes en el microbioma de la planta o la adición de un conjunto de microorganismos que ayuden a combatir la enfermedad. Estos microorganismos pueden aumentar la

resistencia natural de la planta a los parásitos, competir por el mismo nicho o nutrientes o directamente generar antibiosis (biocontrol)^{35,36}.

- La estimulación de los microorganismos que promueven el crecimiento saludable de la planta, gracias a la fijación de nitrógeno, la movilización de nutrientes, ya sea fósforo u otros minerales, o la producción de fitohormonas³⁷⁻⁴⁰.

De esta manera, el conocimiento de la microbiota asociada a la planta puede ayudar a minimizar el uso de productos sanitarios de origen químico, y aumentar la producción de biomasa vegetal sin recurrir a productos perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. Además, para la viabilidad de las plantas es importante el estado del suelo, y un estado saludable de este se define como la capacidad de funcionar como un sistema de soporte vital, dentro de los límites del ecosistema y el uso de la tierra, para mantener una productividad biológica, mantener la calidad del aire y del agua y promover la salud de las plantas, animales y personas⁴¹. Esta capacidad como soporte vital viene conferida tanto por factores abióticos (pH, salinidad...), como bióticos, una parte fundamental de los cuales es el microbioma.

1.1 Las interacciones entre la planta y la microbiota asociada

Las plantas, como todos los seres vivos, establecen interacciones con multitud de microorganismos, de manera que afectan tanto al desarrollo como a la supervivencia de las mismas; por lo que todos los seres vivos, incluidas las plantas, pueden ser considerados como metaorganismos. Así pues, la planta depende de su microbiota para obtener determinados beneficios (obtención de nutrientes y escudo contra enfermedades, entre otros) y a cambio, la planta les proporciona nutrientes en forma de exudados que pueden representar hasta un 21% del carbono que fija fotosintéticamente⁴². Diversos estudios consideran estas interacciones cruciales para entender la salud de las plantas y su adaptación al estrés tanto biótico, como abiótico^{43,44}, así como un elemento básico para poder conseguir unos cultivos sostenibles⁴⁵.

La comunicación entre la planta y los microorganismos asociados, así como la comunicación entre los propios microorganismos⁴⁶ se produce a través de la percepción de quorum (*Quorum Sensing*). Se trata de un mecanismo de regulación génica implicado en actividades microbianas como la producción de antibióticos, la formación de *biofilms*, la conjugación, la movilidad, la simbiosis y la virulencia, entre otros⁴⁷. La comunicación entre Dominios se produce mediante moléculas autoinducidas, como las AHL (*N-acyl homoserine lactone*)^{48,49} en bacterias Gram negativas. Las plantas responden a las moléculas autoinducidas e incluso son capaces de mimetizarlas⁵⁰.

Los desequilibrios en el microbioma o disbiosis pueden ser los desencadenantes de las enfermedades o favorecerlas. Esta disbiosis la pueden causar microorganismos ya presentes que cambian su abundancia u otros transportados por el aire o por los animales. Las plantas pueden presentar resistencia a estas enfermedades, que se define como la capacidad de suprimir una infección, su desarrollo y/o la reproducción de los parásitos⁵¹. La resistencia puede ser debida a los propios genes de la planta⁵² o inducida por las interacciones con los microorganismos que forman parte del microbioma⁵³. Estos microorganismos que ayudan a reprimir una enfermedad son los llamados agentes de control biológico o biocontrol. Los agentes de control biológico pueden utilizar uno o varios mecanismos, como antibiosis, micoparasitismo, competencia e inducción de resistencia generalizada en la planta^{54,55}.

1.1.1 La filosfera

El término filosfera fue propuesto de forma casi simultánea por Last (1955)⁵⁶ y Ruinen (1956)⁵⁷ en contraposición con el término rizosfera. Ruinen lo trataba en el 1961 como “un ambiente ecológico descuidado”, dato que sorprende teniendo en cuenta la abundancia de plantas en la superficie terrestre, y el papel relevante de las relaciones que éstas establecen con los microorganismos.

La filosfera se corresponde con la parte aérea de la planta, mayormente las hojas, pero también, los frutos, yemas, flores y ramas⁵⁷. Esto hace de la filosfera un hábitat enorme a lo largo del globo terrestre. Se calcula que hay unos 5×10^8 km² de hojas, lo

que representa unos 1×10^9 km² contando el anverso y reverso de la hoja⁵⁸. En la filosfera la concentración de bacterias²⁷ es de alrededor de 10^6 - 10^7 células por cm², mientras que la microbiota fúngica es numéricamente inferior⁵⁹, así pues, la superficie de las hojas constituye uno de los hábitats más extensos de la Tierra, estimándose una población bacteriana de 10^{26} células²⁷. Aunque inicialmente el estudio de la filosfera se focalizaba en los microorganismos patógenos, debido a las pérdidas económicas que éstos ocasionan, la mayor parte de los microorganismos que viven en la filosfera son comensales, y las interacciones de estos últimos con las plantas han sido menos estudiadas⁶⁰. No obstante, debido a la importancia ya mencionada de los microorganismos comensales, sería interesante disponer de una descripción completa del microbioma de la planta. En la filosfera, los microorganismos comensales tienen un modo de vida mayormente epífita, es decir, adheridos a la superficie; mientras que los patógenos comienzan la invasión de forma epífita para pasar a ser endófitos, entrando en el apoplasto por aberturas naturales como los estomas⁶¹. Para algunos microorganismos de la filosfera la planta es su hábitat natural, son autóctonos, quedan como reservorio en las partes perennes (ramas, tronco...) cuando las partes aéreas perecederas de la planta (hojas, frutos, flores...) se desprenden y vuelven a ser colonizadas en el siguiente ciclo fenológico. Pero, también hay una parte de la microbiota que proviene de transporte horizontal a través del suelo, del aire o de otras plantas⁶². En las plantas caducifolias esta renovación es total, por ello las poblaciones microbianas de la filosfera son efímeras, a diferencia de las de la rizosfera que no se renuevan anualmente. Además, los microorganismos de la filosfera están expuestos a diversos factores de estrés abiótico y biótico. La filosfera es un ambiente oligotrófico, ya que la cera que cubre la cutícula reduce la evaporación del agua y lixivia los metabolitos secundarios de la planta. Asimismo, están expuestos a elevada radiación UV, los cambios de humedad y temperatura, el viento y la presencia de metabolitos antimicrobianos, ya sean propios de la planta o de otros microorganismos competidores. Para disminuir el impacto de estas condiciones adversas, las bacterias desarrollan grandes agregados⁶³ recubiertos de polímeros extracelulares²⁷, los llamados biofilms. Los hongos se comportan de forma diferente y tienden a colonizar las hojas en forma de células solitarias (o esporas), y de manera infrecuente en hifas o

pseudohifas⁶⁴. Las poblaciones microbianas tienden a estar cerca de las venas, en las grietas de las células epidérmicas y en la base de los tricomas^{59,64}.

Vorholt⁶¹ en un artículo de revisión sobre la filosfera, concluye que la comunidad microbiana es predecible y que está compuesta por unos pocos filos dominantes y presenta una diversidad inferior a la rizosfera^{65,66}. Uno de los filos dominantes de la filosfera es el de Proteobacterias, específicamente las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria^{67,68}, seguidos por los filos Bacteroidetes y Actinobacterias^{65,66,69}. *Methylobacterium*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas*⁶² son los géneros que encontramos de forma más habitual en la filosfera, pero hay diversos elementos clave (los denominados *drivers*) que pueden modificar la composición de los microbiomas. Algunos de estos *drivers* son el genotipo de la planta^{70,71}, los factores medioambientales, como la estacionalidad y el estrés hídrico⁷² y los factores bióticos, como la presencia de patógenos o el ciclo fenológico de la planta⁷³.

Los microorganismos presentes en la filosfera de la planta están implicados en diversas funciones como la fijación de nitrógeno⁷⁴, favorecer el crecimiento de la planta^{75,76} así como la inhibición de microorganismos patógenos⁷⁶. Cabe resaltar que la adición de fertilizantes provoca una disminución de los índices de diversidad y la riqueza de las poblaciones microbianas de la filosfera, ya que la planta dispone de una mayor accesibilidad a nutrientes asimilables y no necesitan la cooperación fisiológica de los microorganismos⁶⁹.

El conocimiento de los microorganismos presentes en la filosfera, así como de los factores que hacen variar la composición de esa comunidad nos ayudará a diseñar una estrategia para combatir las enfermedades, así como aumentar la biomasa de las plantas. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido caracterizar el microbioma de la filosfera de *Malus domestica* y de *Pyrus communis*, determinar cuáles son las comunidades más abundantes y buscar un posible conjunto de microorganismos que permanezcan a lo largo de todo el ciclo de la planta (*core*).

Los estados fenológicos de la planta y su implicación en la sucesión de las poblaciones microbianas

En 1849 el botánico Charles Morren utiliza el término fenología por primera vez, pero no aparece en un artículo científico hasta 1853, “Souvenirs phénologiques de l’hiver 1852–1853” que él mismo escribió⁷⁷. Según la RAE⁷⁸, la fenología es el estudio de los fenómenos biológicos en relación con el clima, particularmente los cambios estacionales. En nuestro estudio la fenología se refiere a los cambios que se suceden en el árbol a lo largo de un ciclo vegetativo, cambios como la aparición de las hojas, la floración o la aparición del fruto.

La sucesión es un proceso de cambios en la comunidad, razonablemente direccional y predecible como resultado de la modificación del entorno físico y biológico, y que tiende a culminar en un ecosistema estabilizado, denominado clímax, en el que se mantiene la máxima biomasa y función simbiótica entre organismos⁷⁹. En este trabajo se ha estudiado la dinámica de las poblaciones microbianas a lo largo de las diferentes fases del ciclo fenológico del árbol, como motor de cambio en la sucesión del microbioma asociado a la filosfera. Existen diversos estudios sobre la sucesión del microbioma de la rizosfera en las diferentes etapas del ciclo fenológico del árbol^{80,81}, pero son escasos los trabajos sobre filosfera y estos se centran principalmente en el estadio de floración⁸².

Redford y Fierer⁸³ estudiaron la sucesión bacteriana en las hojas de *Populus deltoides* durante dos ciclos anuales. El estudio estaba centrado en las hojas, dejando de lado otros elementos de la filosfera. Las muestras se recogieron mensualmente, sin tener en cuenta los cambios fenológicos del árbol. Los resultados obtenidos les permitieron concluir que:

- Había cambios en las comunidades bacterianas a lo largo del año, por lo tanto, se producía el fenómeno de la sucesión.
- La evolución de la comunidad era cíclica. Los meses iniciales y finales del ciclo anual presentaban una comunidad más similar entre ellos respecto a los meses intermedios. Se ha de tener en cuenta que las hojas caen y se ha de volver a

establecer una nueva comunidad, de un año a otro. La explicación de esta predictibilidad en las comunidades iniciales podría deberse a la propiedad del árbol como reservorio de algunos de estos microorganismos que después colonizarán las hojas.

Debido a la falta de bibliografía que relacione el estado fenológico del árbol con los cambios en la microbiota presente en la filosfera, sobre todo respecto de la comunidad fúngica, en este estudio se han analizado las sucesión en las comunidades bacterianas y fúngicas de la filosfera a lo largo de los diferentes estadios fenológicos de dos árboles frutales producidos en Cataluña y con un gran impacto económico como son, *Malus domestica* var *Golden delicious* y *Pyrus communis* var *Passe crassane*.

1.1.2 La rizosfera

Hiltner en 1904 definió la rizosfera como el suelo que envuelve la raíz, así como los microorganismos residentes que están bajo la influencia de los exudados radiculares⁸⁴. Además, fue el primero en sugerir que los microorganismos rizosféricos tenían una gran importancia para el crecimiento y la salud de la planta. La rizosfera se caracteriza por presentar una elevada abundancia de microorganismos⁸⁵, que están activos⁸⁶ y cuya actividad se ha demostrado esencial para el crecimiento de la planta, creando un primer escudo protector contra los patógenos del suelo^{39,87}. La ratio de microorganismos estimada por gramo de raíz es de 10^{9-11} células⁸⁸.

En el suelo rizosférico la concentración de microorganismos es superior a la del suelo sin enraizar⁸⁹. Al igual que en la filosfera, esta interacción es provechosa para ambos, las plantas y el microbioma rizosférico⁹⁰. Los microorganismos del suelo son atraídos quimiotácticamente por los exudados ricos en carbono de la planta³⁸ hacia la rizosfera. Debido a que los exudados son distintos, en las diferentes especies de plantas⁹¹ los microbiomas de la rizosfera también difieren entre las especies vegetales^{85,92-94} y su estado de desarrollo⁹⁵. Algunos trabajos demuestran incluso diferencias en las comunidades microbianas de la rizosfera de diferentes cultivares de la misma especie^{96,97}. En *Arabidopsis thaliana*, la diferencia entre el suelo sin enraizar y el suelo enraizado es una mayor presencia de Actinobacteria y Proteobacteria en el

enraizado^{98,99}, así como una disminución de los filos Acidobacteria, Verrucomicrobia y Gemmatimonadetes, respecto al no enraizado⁶².

La rizosfera, es una zona con una gran abundancia y diversidad de microorganismos, siendo además un reservorio de patógenos facultativos de humanos^{100,101}. Varios géneros bacterianos, incluidos *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*, contienen cepas asociadas a raíces que además son patógenos oportunistas de humanos. Los mecanismos de colonización de la rizosfera y la actividad antimicrobiana de estos microorganismos son similares a los mecanismos utilizados durante la colonización e infección de órganos y tejidos humanos. Esto hace más relevante el problema de las multiresistencias provocadas por el uso de antibióticos en los ecosistemas agrícolas.

Los factores limitantes para el crecimiento de las plantas suelen ser la falta de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno y, en menor medida, el hierro⁴⁰. La solución a este problema no proviene de la adición de fertilizantes inorgánicos, ya que en algunos casos, como el del fósforo, es abundante en el suelo, pero está ligado a aluminio o a calcio y la planta lo necesita en forma de fosfato soluble¹⁰². Esta solubilización la hacen posible tanto bacterias de la rizosfera¹⁰³, como hongos micorrícicos¹⁰⁴. Dentro de estos microorganismos que habitan en la rizosfera, las PGPR son las que tienen más efectos beneficiosos para las plantas¹⁰⁵, colonizan las raíces y estimulan el crecimiento de la planta y/o reducen la incidencia de la enfermedad. Además de la solubilización del fosfato, las PGPR son capaces de fijar nitrógeno, el ejemplo más claro y eficiente es la nodulación, característica de los géneros *Rhizobium*¹⁰⁶ y *Frankia*^{107,108}. Además, existen otras bacterias que son capaces de fijar nitrógeno de manera endófitas en las raíces¹⁰⁸, por ejemplo, *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *G. diazotrophicus*, es una bacteria simbiote de caña de azúcar con la capacidad de fijar nitrógeno, para comprobar el efecto promotor del crecimiento de la planta de esta fijación endófitas de nitrógeno se diseñó un mutante *nif* que no era capaz de fijar nitrógeno. Los mutantes que entraban en simbiosis con las plantas veían reducida la capacidad de mejorar el crecimiento cuando se comparaban con la cepa salvaje en caña de azúcar¹⁰⁹. Las PGPR también son

capaces de secuestrar el hierro en los sideróforos¹¹⁰, que tienen más afinidad por el Fe^{3+} que los de las plantas, así además de aportar una mayor cantidad de hierro, hacen que el crecimiento de otros microorganismos que pueden ser patógenos (especialmente hongos) sea más lento¹¹¹⁻¹¹³. Además de la solubilización de nutrientes limitantes para las plantas, las PGPR pueden secretar metabolitos fungicidas¹¹⁴ y estimular el crecimiento de estas mediante la producción de fitohormonas, como las auxinas o las citoquinas, y estimulantes del crecimiento, como el etileno o el 2,3-butanediol^{40,115}. Estos microorganismos son una opción para reducir la utilización de fertilizantes inorgánicos ya que aportan esos nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta, además en la forma óptima para su absorción por parte de la planta.

Suelos supresivos

Los suelos supresivos han sido descritos por Baker y Cook como suelos en los cuales la severidad o incidencia de una enfermedad se mantiene baja, a pesar de la presencia del patógeno, la susceptibilidad de la planta y las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad¹¹⁶. La microbiota residente en los suelos supresivos es en gran parte responsable de esta capacidad^{39,117}, y las siguientes características lo demuestran¹¹⁷:

- Cuando un suelo se pasteuriza o se autoclava pierde su capacidad supresora.
- La capacidad supresora puede ser transferible, inoculando de un 1 a un 10% del suelo supresivo a un suelo conductivo.
- La bajada del pH de 8 a 6 añadiendo H_2SO_4 disminuye la supresividad de este suelo. Algo que hay que tener en cuenta al aplicar fertilizantes, y en suelos que sean muy ácidos.
- Años de monocultivo pueden inducir la capacidad supresora en algunos suelos.

Unos altos índices de diversidad microbiana están relacionados con el fenómeno de la supresividad, pero tan importante como la diversidad de especies, lo son las diferencias en la funcionalidad de los individuos¹¹⁸. Las enfermedades transmitidas por el suelo son a menudo menos graves en las granjas ecológicas, posiblemente debido a

una mayor diversidad de microorganismos que interactúan de forma beneficiosa con la planta¹¹⁹, de igual manera que pasaba en la filosfera.

Se han descrito suelos supresivos para multitud de patógenos, bacterias, hongos, nematodos y oomicetos, en este trabajo nos centraremos en los suelos supresivos para nematodos. Los RKN (*Root-Knot Nematodes*), son nematodos que infectan diferentes especies vegetales de interés agrícola y causan unas pérdidas mundiales anuales de unos 1.000 millones de dólares¹²⁰. Los juveniles de segunda etapa (J2) de RKN entran en las raíces del huésped por la zona de elongación, a través del apoplasto, inyectando proteína en sus células mediante un estilete hueco para facilitar la migración, manipular sus funciones y suprimir las defensas de la planta¹²¹. Las proteínas secretadas para facilitar la migración consisten en una mezcla de enzimas que degradan la celulosa, la hemi-celulosa o la pectina¹²². La célula perforada por el estilete es la célula llamada sincitial inicial, a partir de esta, mediante la degradación parcial de la pared celular se forman células gigantes con múltiples núcleos agrandados que será lo que dará como resultado las características agallas o nudos¹²³. Estos sincitios son las células de las que se alimentarán los nematodos. *Meloidogyne spp* es el nematodo endoparasítico de plantas que más pérdidas económicas ha causado a nivel mundial^{124,125}. En España son responsables de grandes pérdidas en cultivos de tomate^{126,127}, pepino¹²⁸, sandía¹²⁹ y calabacín¹³⁰. Aunque, hoy en día ya han sido descritos suelos supresivos para nematodos fitopatógenos¹³¹, la mayoría de los estudios se centran en un área geográfica y un cultivo concreto^{132,133}. Por eso, en el capítulo 4 de este trabajo se ha analizado la diversidad microbiana de suelos supresivos de diferentes zonas geográficas y con diferentes especies cultivadas en comparación con suelos conductivos para *Meloidogyne spp*. Con ello, se pretende encontrar microorganismos presentes en suelos con diferentes características físico-químicas, y ambientales pero que coinciden en la capacidad supresora para *Meloidogyne spp*.

Los suelos supresivos no son la única solución a las infecciones por nematodos, las plantas con resistencias a nematodos son una alternativa económica¹²⁶, pero tienen dos problemas, por el momento hay disponibles cultivares de pocas especies con estas

resistencias, y además el uso continuo de estos cultivares puede propiciar la selección de poblaciones de nematodos especialmente virulentos¹³⁴. Por lo que, a día de hoy, el uso de suelos supresivos es una alternativa mejor. Dadas las diferentes opciones para el tratamiento de nematodos fitopatógenos, otro objetivo marcado en este trabajo ha sido analizar el impacto de diferentes aproximaciones en el control del nematodo *Meloidogyne incognita*, como son la tipología del suelo, la variedad vegetal sembrada, o la adición de un agente de biocontrol, sobre el microbioma rizosférico.

1.2 Técnicas moleculares aplicadas al estudio del microbioma del agroecosistema

El hecho de que la gran mayoría de los microorganismos asociados a plantas, así como en toda la biosfera, puedan ser viables o metabólicamente activos pero no cultivables en los medios utilizados comúnmente, ha propiciado la utilización de técnicas independientes de cultivo en la investigación de la microbiota de las plantas¹³⁵. Diferentes estudios han probado que solamente entre un 0,1 y un 10% del total de bacterias cuantificadas mediante qPCR son cultivables^{136,137}. Yashiro et al¹³⁸ realizaron un estudio comparativo entre métodos dependientes e independientes de cultivo en la filosfera de manzano, en el cual determinaron que había, al menos, de 100 a 1000 veces más células bacterianas en las hojas de manzano que las estimadas en cultivo con TSA (*Trypticase soy agar*), corroborando los estudios citados anteriormente.

Las debilidades de los métodos moleculares dependientes de la amplificación mediante PCR son la sensibilidad a inhibidores, la posibilidad de sesgo de los cebadores, la dificultad de obtener una información cuantitativa precisa y la posibilidad de interferencia debido a la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos derivadas de orgánulos de las células vegetales, sobre todo cuando se utiliza cebadores universales para el dominio bacteria^{139,140}, dada su similitud con el gen del RNA ribosómico 16S de procariontas. En este sentido, la elección de los cebadores es un proceso esencial, sobre todo para las muestras de filosfera, ya que las muestras de rizosfera recogidas fueron de la tierra circundante a la raíz, pero con poca presencia de

material vegetal. Tras una búsqueda bibliográfica se optó utilizar la pareja de cebadores 799f-1492r¹⁴¹, los cuales fueron diseñados para solventar este problema técnico, ya que nos permiten separar el DNA amplificado correspondiente a las poblaciones procariotas del correspondiente al cloroplasto vegetal en un gel de agarosa^{142,143} por su diferencia de tamaño.

El desarrollo de metodologías moleculares independientes de cultivo ha sido muy rápido, tanto en lo referente a métodos dependientes como independientes de PCR¹⁴⁴. En el estudio del microbioma de la filosfera de peral y manzano a lo largo del desarrollo fenológico del árbol se utilizaron tres técnicas moleculares dependientes de la PCR (DGGE, genotecas y secuenciación masiva: Illumina MiSeq). Mientras que en el estudio de la rizosfera de suelos supresivos para RKN se utilizó solamente la DGGE y la secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq. La combinación de diferentes metodologías moleculares proporcionará unos resultados más fiables en el estudio de la diversidad microbiana, ya que se podrán sumar sus puntos fuertes, minimizando las debilidades de cada una de ellas.

Capítulo 2. Objetivos

El objetivo global de esta tesis es contribuir al desarrollo de unas buenas prácticas agrícolas, enfocadas en garantizar la sostenibilidad ambiental, a través del conocimiento de la microbiota asociada al agroecosistema. Para ello nos hemos marcado los siguientes objetivos:

- Caracterizar la microbiota bacteriana y fúngica asociada a la filosfera de dos árboles frutales de pepita como son *Malus domestica* var *Golden delicious* y *Pyrus communis* var *Passe crassane*.
- Estudiar las sucesiones de las poblaciones microbianas de la filosfera de *Malus domestica* var *Golden delicious* y *Pyrus communis* var *Passe crassane* a lo largo de su desarrollo fenológico.
- Identificar que microorganismos presentes en el suelo determinan su carácter supresivo frente al nematodo *Meloidogyne spp.*, a través de la comparación con la microbiota asociada a suelos conductivos para la enfermedad.
- Evaluar el impacto de la adición de *Trichoderma asperellum*, un agente de biocontrol para nematodos noduladores de raíz, sobre el bacterioma y el micobioma de suelos supresivos sembrados con dos variedades de *Solanum lycopersicum* una resistente y otra sensible a *Meloidogyne incognita*.

Capítulo 3. Material y métodos

3.1 Zonas de muestreo

El estudio realizado se centra en la caracterización de la microbiota asociada a diferentes agroecosistemas. En primer lugar, se ha analizado la diversidad microbiana de la filosfera de dos especies de árboles frutales de la familia de las rosáceas a lo largo de su desarrollo fenológico. Dicho trabajo se ha llevado a cabo en Girona, a partir de muestras tomadas en 2006 en diferentes fincas experimentales de la *Fundació Mas Badia*. En cuanto a la caracterización de las comunidades microbianas de los suelos supresivos para *Meloidogyne spp*, nematodo fitopatógeno que induce la formación de agallas, se realizaron muestreos a lo largo de 2015 y 2016 en diferentes fincas localizadas en Barcelona y Tarragona, en el nordeste de la península Ibérica.

3.1.1 Finca experimental de la Fundació Mas Badia – IRTA

La finca experimental de la *Fundació Mas Badia* (42°03'15.8"N 3°03'42.6"E), situada en el término municipal de la *Tallada d'Empordà*, Girona (Catalunya, España), es uno de los centros consorciados del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (IRTA) (Figura 3.1).

La fundación dispone de una finca de 30 hectáreas con diversas instalaciones y un equipo humano altamente cualificado dedicado a la investigación y desarrollo en áreas de fruticultura, cultivos extensivos, protección de cultivos, agrometeorología y especies forestales de crecimiento rápido (<http://www.irta.cat/ca/centre/mas-badia/>)

El término municipal de la *Tallada d'Empordà* está situado en el *Baix Empordà*, a una altitud de 20 metros sobre el nivel del mar. El clima de la zona es mediterráneo litoral norte, caracterizado por veranos relativamente calurosos e inviernos moderados, con una amplitud térmica baja, (p. ej. 18,6 °C en 2006). La precipitación se distribuye regularmente a lo largo de todo el año (600 mm de media) con un máximo destacado en otoño (Figura 3.2 y Tabla 3.1).

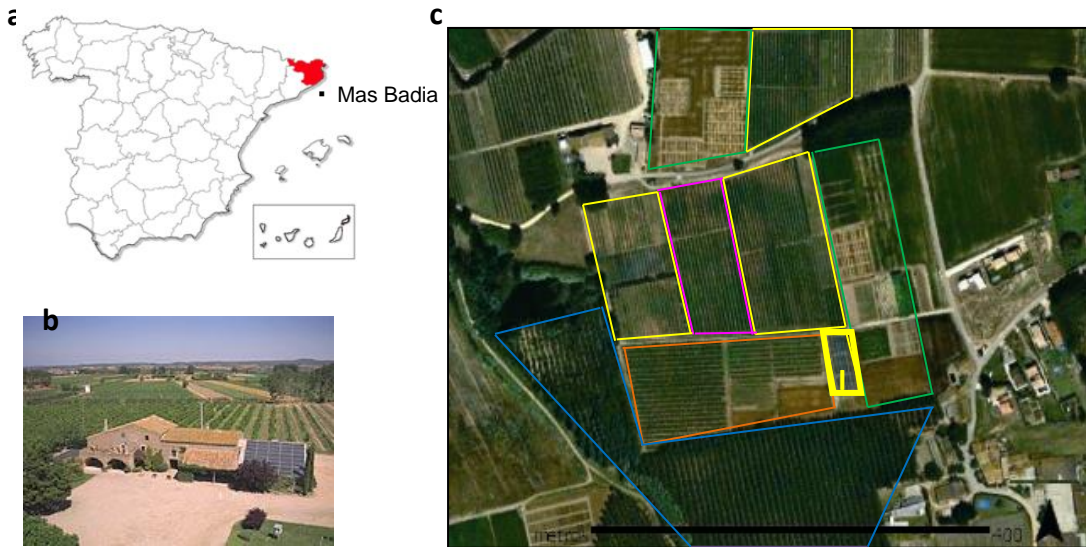


Figura 3.1 a) Localización geográfica de la *Fundació Mas Badia*, en la provincia de *Girona*, en el Nordeste de la península Ibérica. b) Foto de la masía de la *Fundació Mas Badia* Irta. c) Vista aérea de la finca de *Mas Badia* (Fuente: Google Earth, earth.google.com/web/), en la imagen se han resaltado de distintos colores los diferentes tipos de cultivo existentes en la finca en 2006: manzanos (amarillo), perales (rosa), cereales (verde), melocotoneros (naranja) y chopos (azul). También se ha destacado la zona de muestreo (I).

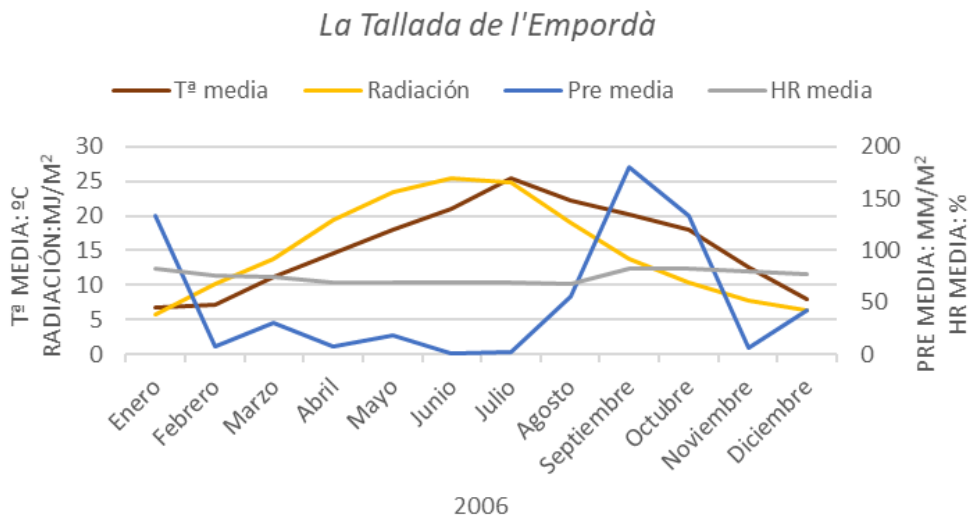


Figura 3.2 Condiciones meteorológicas registradas en la estación de *La tallada de l'Empordà* en 2006. Tª media: Temperatura media en °C. Radiación en MJ/m². Pre media: precipitación media expresada en mm/m². HR media: Porcentaje de humedad relativa media del mes. Fuente: Meteocat

3.1.2 Fornells de la Selva

La *fundació Mas Badia* dispone de un campo experimental de perales de la variedad *Passe Crassane* en el término municipal de *Fornells de la Selva, Girona (Catalunya, España)* ($41^{\circ}54'25.85''\text{N}$, $2^{\circ}49'12.53''\text{E}$), (Figura 3.3)



Figura 3.3 a) Localización geográfica de la finca experimental de *Fornells de la Selva*, en el Nordeste de la península Ibérica. B) Vista aérea de la plantación de perales en *Fornells de la Selva* donde se ha destacado la zona de muestreo (cuadrado rosa). (Fuente: Google Earth, earth.google.com/web/).

La parcela objeto de estudio consta de cuatro filas de perales, de las cuales, la más cercana a la carretera tiene menos árboles; mientras que las otras tres tienen aproximadamente cien árboles cada una. Para los estudios de caracterización de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol se han tomado muestras de los cinco árboles centrales de cada una de las tres filas más lejanas a la carretera (ver esquema en apartado 2.2.1).

El municipio de *Fornells de la Selva* está situado en la comarca del *Gironès*, a una altitud de 102 m sobre el nivel del mar. Su clima es también mediterráneo, en este caso prelitoral norte. Presenta inviernos moderados y veranos calurosos, con una amplitud térmica media-baja. El periodo en el que no se producen heladas se sitúa entre mayo y septiembre. La precipitación media anual es superior a los 700 mm, siendo otoño y primavera los periodos de máxima precipitación y solo julio puede

considerarse árido. Durante el año 2006 la precipitación anual estuvo por debajo de la media (tabla 3.1).

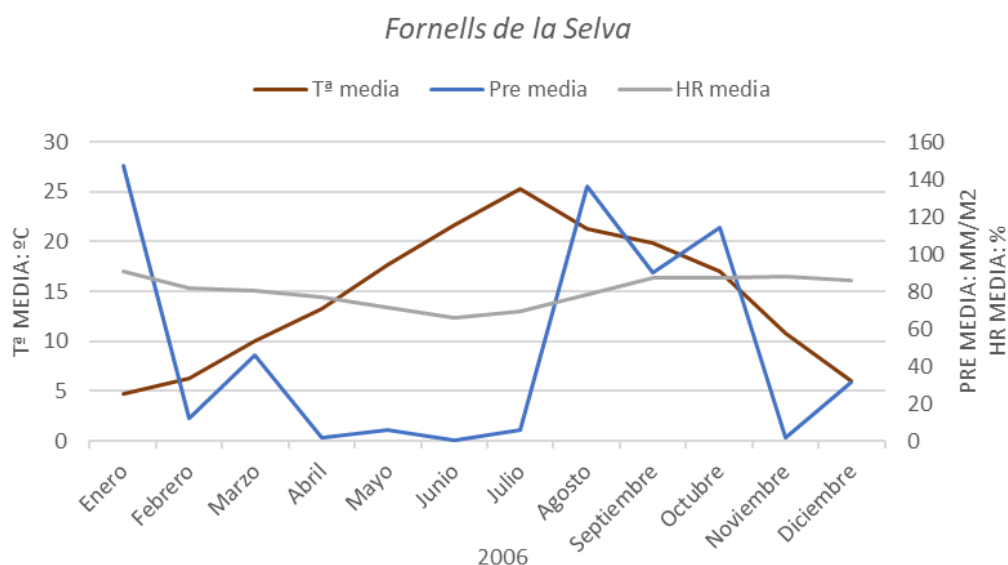


Figura 3.4 Condiciones meteorológicas registradas en la finca de *Fornells de la Selva*. Tª media: Temperatura media en °C. Pre media: precipitación media expresada en mm/m². HR media: Porcentaje de humedad relativa media del mes. Fuente: Meteocat

Tabla 3.1.- Parámetros meteorológicos que caracterizan las zonas de muestreo registrados durante el período objeto de estudio. Fuente: Meteocat

Parámetro	<i>La Tallada d'Empordà</i>	<i>Fornells de la Selva</i>
Temperatura media	15,5 °C	14,5 °C
Amplitud térmica	18,6 °C	20,6 °C
Temperatura máxima media	20,9 °C	22,8 °C
Temperatura máxima media del mes más cálido	31,7 °C (julio)	34,9 °C (julio)
Temperatura mínima media	10,1 °C	7,4 °C
Temperatura mínima media del mes más frío	2,1 °C (enero)	-0,7 °C (enero)
Precipitación anual	616,4 mm	593,1 mm

3.1.3 Alcanar

La empresa *Verdures Ecològiques Ecomallades*, que como cuyo nombre indica es una empresa de frutas y verduras ecológicas, posee varios invernaderos situados en la población de *Alcanar* en la provincia de *Tarragona*, en el nordeste de España (Fig. 3.5).

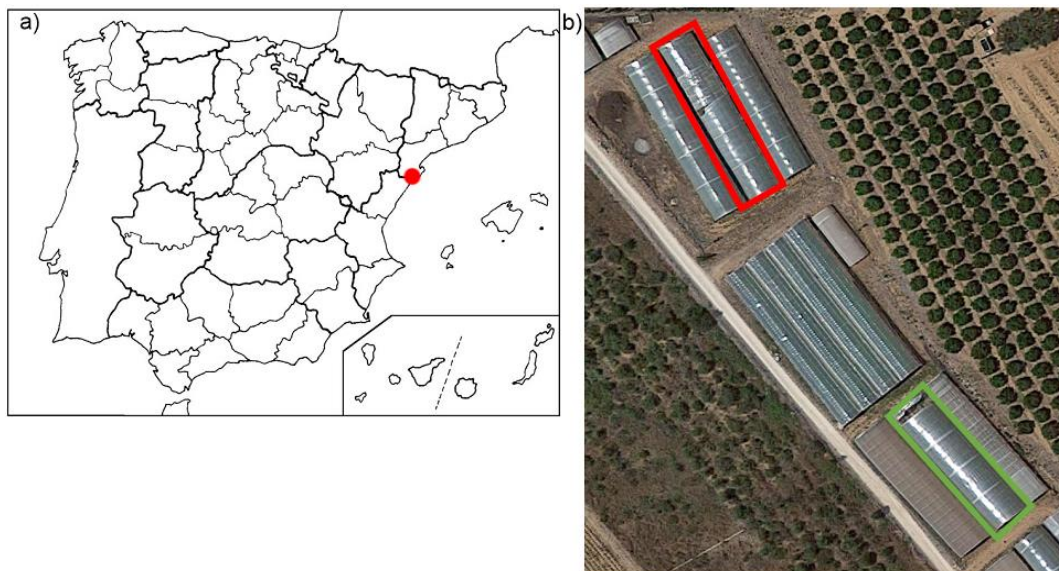


Figura 3.5. a) Localización geográfica de los invernaderos de *Alcanar*, en Tarragona, en el nordeste de la Península Ibérica. b) Vista aérea de los invernaderos objeto de estudio, en rojo Kyoto y en verde Hidalgo (Fuente: Google Earth, earth.google.com/web/).

En este caso, se estudiaron los suelos de dos invernaderos, uno de ellos, Hidalgo ($40^{\circ}32'31.84''\text{N}$, $0^{\circ}29'51.71''\text{E}$), supresivo para el nematodo *Meloidogyne spp* y el segundo, Kyoto ($40^{\circ}32'31.84''\text{N}$ $0^{\circ}29'51.71''\text{E}$), que inicialmente era conductivo para este patógeno. El clima del *Montsià* es mediterráneo de tipo litoral sur. Los inviernos son suaves y los veranos calurosos. La precipitación anual varía entre 550 y 600 mm, con máximos en otoño y mínimos en verano (Figura 3.6). Durante 2015 y 2016 los máximos de precipitación tuvieron lugar en otoño y primavera. En 2015 se registró una precipitación total de 488 mm, mientras que en 2016 fue de 361 mm (Tabla 3.2), un poco por debajo de la media anual de la zona.

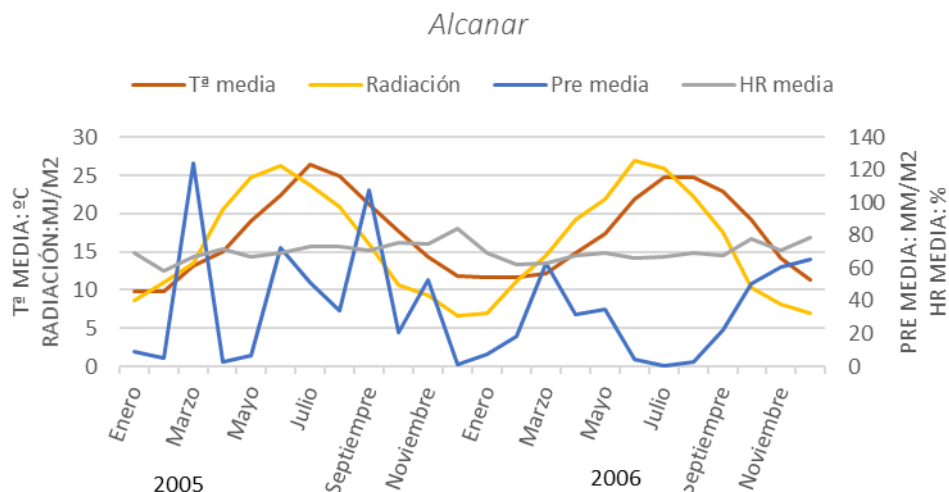


Figura 3.6. Condiciones meteorológicas registradas en Alcanar. Tª media: Temperatura media en °C. Radiación en MJ/m². Pre media: precipitación media en mm/m². HR media: Porcentaje de humedad relativa media del mes. Fuente: Meteocat

3.1.4 Amposta

En Amposta se trabajó con muestras de suelo de un invernadero perteneciente a la empresa *Joan Castellà Verdures Ecològiques* (40°40'35.0"N, 0°34'38"E). Dicho municipio de la comarca del Montsià, pertenece a la provincia de *Tarragona* (Figura 3.7). El suelo de este invernadero, de cultivo ecológico, es supresivo para el nematodo *Meloidogyne spp.*

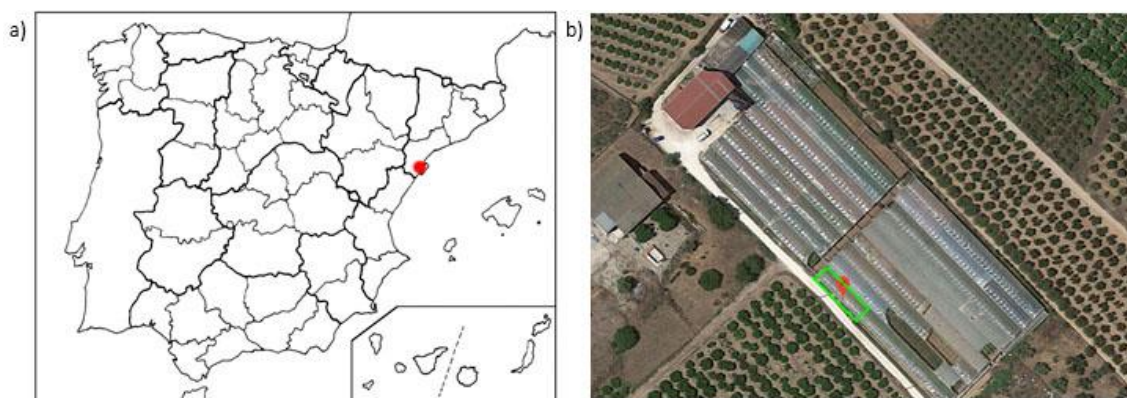


Figura 3.7. a) Localización geográfica del invernadero *Joan Castellà Verdures Ecològiques* (Amposta), en el nordeste de España. b) Vista aérea de la empresa, donde la zona enmarcada en verde corresponde al invernadero objeto de estudio. (Fuente: Google Earth, earth.google.com/web/).

En esta zona los máximos de precipitación se presentan en primavera y otoño, dicho patrón puede observarse durante el año 2016, pero no en el año 2015 (Figura 3.8). La pluviosidad total se situó por debajo de la media, tanto en 2015 y 2016 (tabla 3.2).

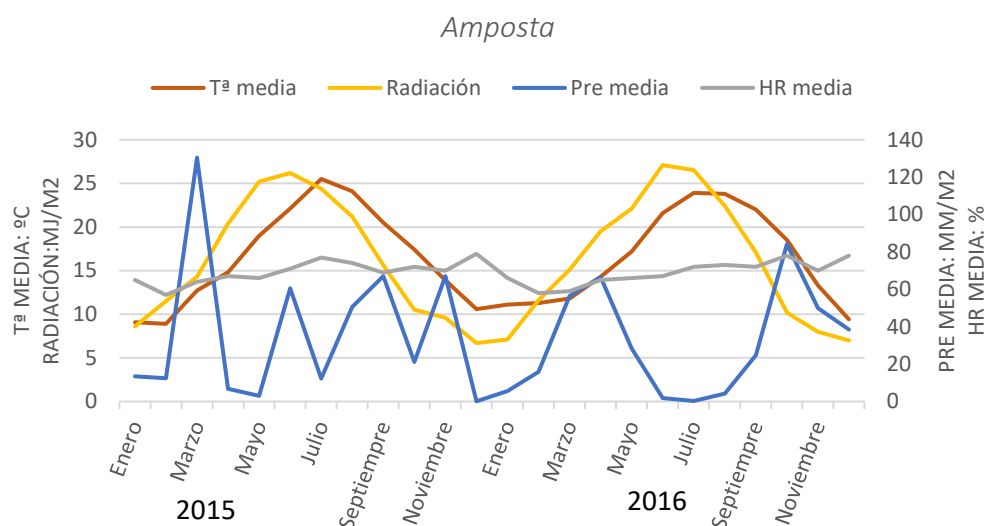


Figura 3.8. Condiciones meteorológicas registradas en la estación de Amposta. Tª media: Temperatura media en °C. Radiación en MJ/m². Pre media: precipitación media expresada en mm/m². HR media: Porcentaje de humedad relativa media del mes. Fuente: Meteocat.

3.1.5 Cabrera de Mar

En *Cabrera de Mar*, municipio perteneciente a la comarca del Maresme, en la provincia de Barcelona, se tomaron muestras de suelo de una explotación hortícola al aire libre, con un sistema de producción integrada, que pertenece a la empresa Horticultura Noé (41°31'5.65"N, 2°24'45.35"E) (Fig. 3.9).

El clima del *Maresme* es mediterráneo, tipo litoral central. La precipitación media anual oscila entre 550 y 800 mm, siendo otoño la estación más lluviosa y verano la más seca. Se caracteriza por inviernos moderados, con temperaturas que oscilan entre 8°C y 10°C y veranos calurosos, entre 22°C y 23°C de media, resultando en una amplitud térmica anual moderada. Como se ve en la figura 3.10, en 2015 no se observaron esos picos de pluviosidad; en cambio, en 2016 las precipitaciones registradas siguieron el patrón que caracteriza este tipo de clima. La pluviosidad en 2015 estuvo muy por debajo de la media anual (355,2 mm) (Tabla 3.2).

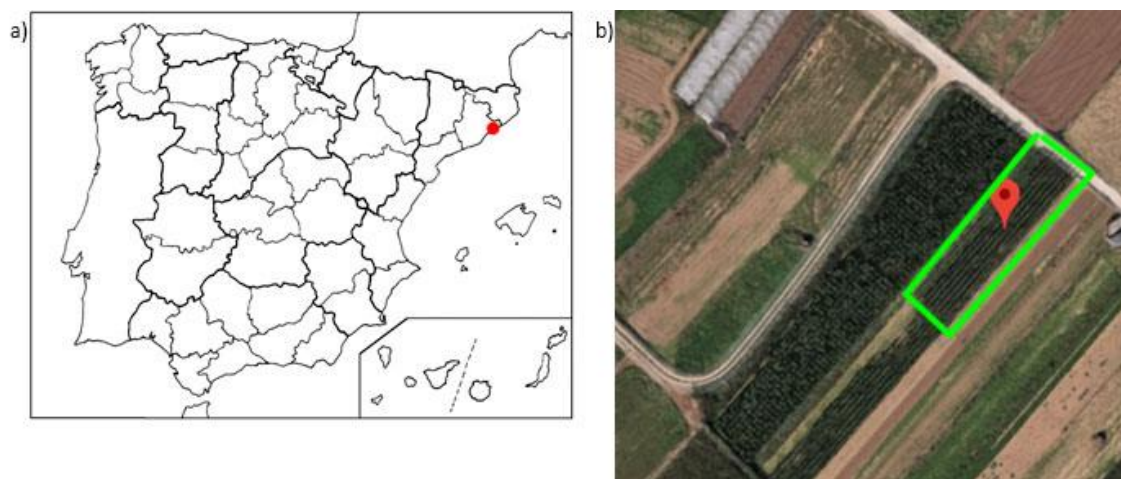


Figura 3.9. a) Localización geográfica de la empresa hortícola de *Cabrera de Mar*, en el noreste de la península Ibérica. b) Vista aérea de la explotación hortícola; en verde se ha destacado el campo de cultivo objeto de estudio. (Fuente: Google Earth, earth.google.com/web/).

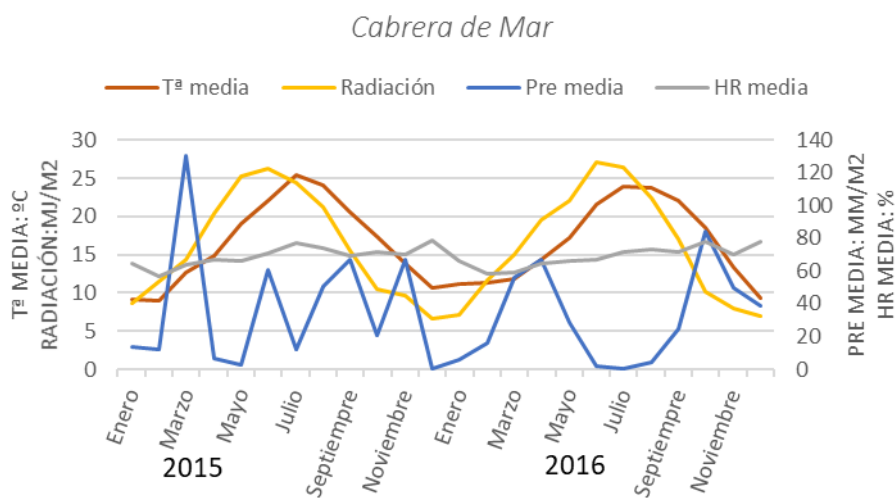


Figura 3.10. Condiciones meteorológicas registradas en la estación de Cabrera de Mar a lo largo de los años en que se enmarca estudio. Tª media: Temperatura media en °C. Radiación en MJ/m². Pre media: precipitación media en mm/m². HR media: Porcentaje de humedad relativa media del mes. Fuente: Meteocat

Tabla 3.2 Parámetros meteorológicos registrados en las zonas de muestreo donde se realizó el estudio comparativo sobre la microbiota de suelos supresivos y conductivos para el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne spp* correspondient a los dos años de realización del estudio. Fuente: Meteocat.

	Año	Alcanar 2015	Amposta 2015	Cabrera de Mar 2015
Temperatura media	2015	17,2 °C	16,6 °C	16,6 °C
	2016	17,2 °C	16,5 °C	16,6 °C
Amplitud térmica	2015	9,1 °C	8,6 °C	8,6 °C
	2016	8,9 °C	8,3 °C	8,5 °C
Temperatura máxima media	2015	21,8 °C	21,2 °C	21,1 °C
	2016	21,7 °C	20,9 °C	21,1 °C
Temperatura máxima media del mes más cálido	2015	30,6 °C (julio)	29,5 °C (julio)	29,4 °C (julio)
	2016	28,9 °C (julio)	28,0 °C (agosto)	28,2 °C (agosto)
Temperatura mínima media	2015	12,7 °C	12,6 °C	12,6 °C
	2016	12,7 °C	12,7 °C	12,6 °C
Temperatura mínima media del mes más frío	2015	4,9 °C (enero)	5,1 °C (enero)	4,5 °C (febrero)
	2016	6,6 °C (febrero)	6,4 °C (febrero)	6,6 °C (febrero)
Precipitación anual	2015	488,1 mm	445 mm	355,2 mm
	2016	361,2 mm	376,5 mm	642,3 mm

3.2 Recogida, transporte y procesamiento de las muestras

3.2.1 Recogida de muestras de la filosfera

Las muestras de la filosfera de manzano fueron recogidas en la Finca experimental de la *Tallada de l'Empordà*, y las de peral en la estación experimental de *Fornells de la Selva*, ambas de la *Fundació Mas Badia*. Dado que el objetivo trazado era determinar las variaciones que experimentaban las poblaciones microbianas epífitas que colonizan la filosfera de dos especies de árboles frutales de la familia de las rosáceas a lo largo del desarrollo fenológico del árbol, se distinguieron 6 estadios, brotación, prefloración, floración, postfloración, cuajado y maduración del fruto, y se tomaron las muestras correspondientes a los mismos, a lo largo de un ciclo anual tal como se indica en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Descripción de los diferentes estadios fenológicos de peral y manzano estudiados y fechas en la que se recolectaron las muestras para cada uno de los mismos.

Estadio fenológico del árbol	Descripción del estadio	Día de recolección de las muestras	
		Manzano	Peral
Brotación	Desarrollo de la yema	23/03/2006	23/03/2006
Prefloración	Aparición de los brotes florales	06/04/2006	31/03/2006
Floración	Plena floración	12/04/2006	06/04/2006
Postfloración	Caída de los primeros pétalos	19/04/2006	12/04/2006
Cuajado del fruto	Cuajado y engrosamiento del fruto	08/05/2006	08/05/2006
Maduración del fruto	Maduración completa del fruto y follaje verde	21/09/2006	21/09/2006

La variedad de manzano objeto de estudio fue *Malus domestica* var *Golden*. La parcela estudiada presentaba 5 filas de árboles, con 66 árboles en cada una de ellas, los cuales no se tratan con productos fitosanitarios. En la Figura 3.11 se puede observar la parcela y también el esquema que muestra la disposición de los árboles e indica aquellos que fueron muestreados. Se recogieron brotes, corimbos florales y hojas, dependiendo del estadio fenológico del árbol, (Figura 3.12), se mezclaron y se repartieron en dos bolsas estériles (réplicas). El número total de muestras tomadas fue de 36 (2 réplicas de cada una de las 3 filas muestreadas para cada uno de los 6 estados fenológicos analizados). Las muestras una vez recogidas, fueron trasladadas al laboratorio a 4°C y se mantuvieron a esta temperatura hasta que fueron procesadas.

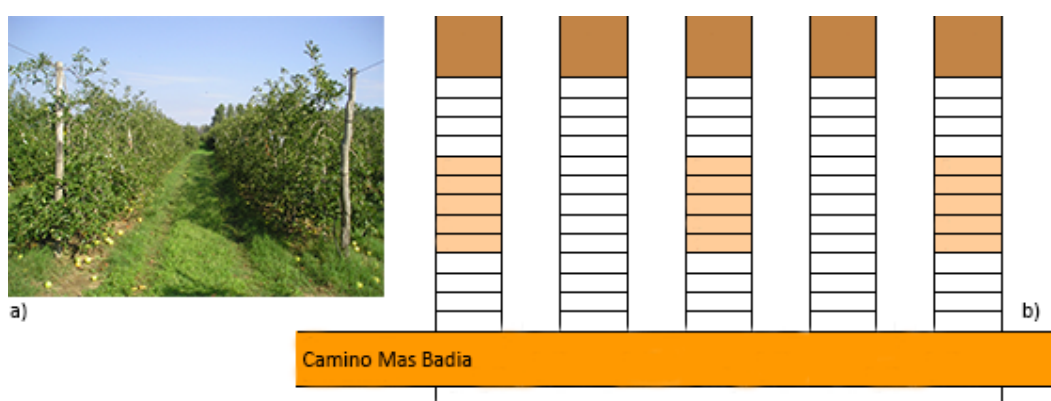


Figura 3.11 a) Fotografía de la parcela de *Malus domestica* var *Golden* de la Finca experimental Mas Badia. b) Esquema que muestra la disposición de los árboles en la parcela, donde cada rectángulo simboliza un árbol. Se tomaron muestras de los árboles centrales de la fila, los cuales están sombreados en color naranja.



Figura 3.12. Composición fotográfica que muestra los diferentes estadios fenológicos de manzano (*Malus domestica* var *Golden*) que fueron analizados. a) brotación, b) prefloración, c) floración, d) postfloración e) cuajado del fruto, f) maduración del fruto.

Pyrus communis var *Passe Crassane* es la variedad de peral cultivada en la parcela experimental de Fornells de la Selva. En este caso sólo hay 4 hileras de árboles, tal y como se muestra en la figura 3.13. Cabe resaltar que se evitaron los árboles que estaban cerca de la carretera. En esta parcela tampoco se realizaron tratamientos fitosanitarios. Se recolectaron el mismo número de muestras que en manzano, y el procedimiento de muestreo fue el mismo (figura 3.14).

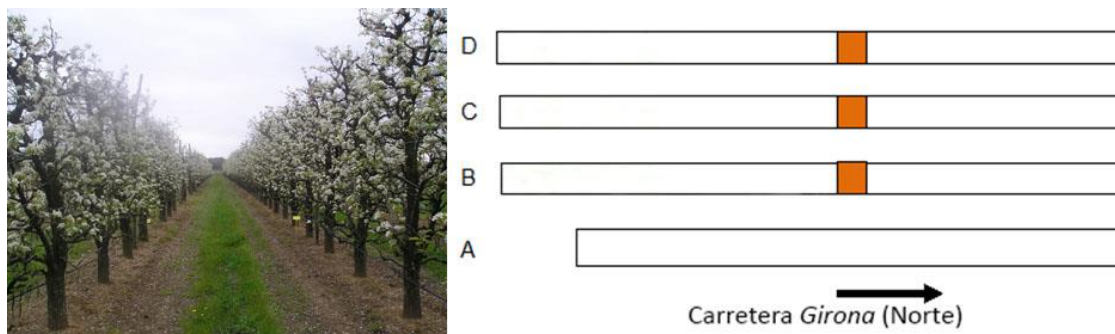


Figura 3.13. Representación esquemática que muestra la disposición de los árboles de la parcela experimental de Fornells de la Selva, en Girona. Cada rectángulo representa una fila de árboles y en naranja se ha destacado la zona central donde se recogieron las muestras.



Figura 3.14. Composición fotográfica que muestra los diferentes estadios fenológicos de peral (*Pyrus communis*) que fueron analizados. a) brotación, b) prefloración, c) floración, d) postfloración e) cuajado del fruto, f) fase de maduración del fruto.

3.2.2 Recogida de las muestras de suelo

Las muestras para el estudio de la microbiota bacteriana y fúngica asociada a suelos supresivos para el nematodo *Meloidogyne spp* se tomaron utilizando unos cilindros de acero inoxidable de 18 mm de diámetro, los cuales eran esterilizados previamente. Dichas barrenas eran introducidas en el suelo hasta una profundidad de 125 mm, y se extraían lentamente para recuperar la muestra del suelo. En todos los casos se descartaron los 5 primeros centímetros. Se tomaron tres réplicas de cada una de las muestras, para cada réplica se cogieron aleatoriamente y a lo largo de toda la parcela experimental 10 submuestras de suelo y se homogeneizaron en bolsas estériles. Los muestreos se realizaron al principio y al final del ciclo de cada cultivo en las distintas

parcelas objeto de estudio (tabla 3.4). Si la parcela era cultivada a los pocos días de la recogida del cultivo anterior se utilizaba la muestra de final de un cultivo, como inicial del siguiente. Las muestras se guardaron a -80°C en tubos Falcon de 50ml hasta su procesamiento.

Tabla 3.4. Fecha en que se realizaron los muestreos para el estudio de la microbiota bacteriana y fúngica asociada a suelos supresivos para el nematodo *Meloidogyne spp* y cultivo existente en el momento de la toma de muestras.

Localización		Muestreo			
		1	2	3	4
Alcanar (Kyoto)	Fecha	15/07/2015	10/10/2015	19/11/2015	
	Cultivo	Tomates	Nabo (inicial)	Nabo (final)	
Alcanar (Hidalgo)	Fecha	15/07/2015	19/11/2015	01/02/2016	26/07/2016
	Cultivo	Berenjena	Lechuga (final)	Lechuga (final)	Tomate (final)
Amposta (Castellà)	Fecha	15/07/2015	10/10/2015	19/11/2015	08/07/2015
	Cultivo	Calabacín	Acelga (inicial)	Acelga (final)	Calabacín (final)
Cabrera de Mar (Noé)	Fecha	28/04/2015	04/08/2015	09/12/2015	07/06/2016
	Cultivo	Calabacín	Calabacín (final)	Habas (inicial)	Habas (final)

3.2.3 Extracción de la microbiota de la filosfera

Una vez en el laboratorio, se procedió a extraer y recuperar las poblaciones microbianas epífitas que colonizaban la filosfera de los árboles frutales estudiados. Dada la naturaleza perecedera de estas muestras, dicha extracción se llevó a cabo, en todos los casos, antes de las 24 horas posteriores a la recogida de las mismas. Con el objetivo de recuperar la microbiota epífita, se añadieron 90 mL de tampón fosfato estéril (0.1M, pH 7) a las bolsas que contenían las muestras, y se colocaron en un agitador orbital (OVAN, Orbital Maxi MD) a 200 rpm durante 30 minutos, seguidos de 7 minutos de sonicación en un baño de ultrasonidos (J.P. Selecta S.A., sin calefacción, modelo: 3001208). Las suspensiones obtenidas se introdujeron en tubos Falcon de 50 ml que fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante; esta operación se repitió varias veces con el fin de procesar el total del líquido presente en la bolsa. Los *pellets* se resuspendieron en 1 mL de tampón fosfato

para realizar el último lavado y se centrifugaron. Finalmente, el pellet se recuperó y se guardó en el congelador a -20°C hasta su utilización.

3.3 Técnicas moleculares

3.3.1 Extracción DNA

Para la extracción de DNA de las muestras se utilizaron dos métodos diferentes en función de las características de las mismas. En el caso de las suspensiones celulares obtenidas a partir de las muestras de la filosfera se utilizó una modificación del método fenol-cloroformo descrito por Zhou y colaboradores¹⁴⁵. De esta manera, los pellets obtenidos tras la recuperación de la microbiota se resuspendieron en un mililitro de tampón de extracción ((100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM *sodium EDTA* [pH 8.0], 100 mM *sodium phosphate* [pH 8.0], 1.5 M NaCl, 1% CTAB), se añadieron 10 µL de lisozima (50 µg/µL) y se incubaron 45 minutos a 37°C. Seguidamente se añadió a cada muestra 5 µL de proteinasa K (10 µg/µL) y 150 µL de dodecil-sulfato de sodio (SDS) (10% wt/vol), y se incubó a 65°C durante 1 hora. Para la separación de las proteínas y la recuperación de los ácidos nucleicos se añadió fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, vol/vol/vol). Finalmente, para concentrar el DNA se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol a -20°C durante toda la noche y seguidamente se procedió a realizar un lavado con etanol 70% a 4°C. Se dejaron secar los pellets y se resuspendieron con 40 µL de agua milliQ estéril. Las extracciones de ácidos nucleicos obtenidas se guardaron a -20°C hasta su utilización.

La extracción de DNA de las muestras de suelos se llevó a cabo con el Kit comercial *PowerSoil DNA isolation kit* (MoBio). Dicha extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada muestra se depositó en un tubo batidor que contenía esferas y solución de lisis, de esta manera se conseguía una homogeneización rápida y completa a la vez que se lisaban las células mediante métodos mecánicos y químicos. A continuación, se aplicó el sobrenadante a una microcolumna y el DNA genómico total fue capturado en una membrana de sílice.

Posteriormente, el DNA fue lavado y eluido de la membrana. Finalmente, el material obtenido (DNA) se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

Independientemente del método utilizado, la calidad y concentración del DNA extraído se comprobó mediante electroforesis horizontal (*Wide Mini-sub cell GT* de Bio-Rad Laboratories), en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 1X, siendo las condiciones de carrera de 1 hora a 75V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, y fueron visualizados y fotografiados digitalmente mediante el documentador de geles Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories).

3.3.2 Amplificación mediante PCR

La amplificación de los fragmentos del gen del RNA ribosómico 16S y de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los genes ribosomales nucleares del genoma de hongos se llevó a cabo utilizando PCRs directas o anidadas, respectivamente, con los pares de cebadores y las condiciones de PCR resumidas en las tablas 2.5 y 2.6. Las parejas de cebadores y sus consiguientes programas de amplificación se escogieron dependiendo de los grupos taxonómicos a estudiar, las características de las muestras, la técnica de análisis utilizada; así como en función de los posibles problemas asociados a algunas parejas de cebadores como se detalla en el apartado 1.3 de la introducción.

Las mezclas de PCR (50 μL) para las amplificaciones contenían 5 μL de tampón de PCR 10x (200 mM Tris-HCl pH: 8.4, 500 mM KCl), 1,5-2 μL de Cloruro de magnesio 50 mM, 0,4 μL de dNTPs premezclados (25 mM), de 0,2 a 1 μL de cada cebador (0,2-1 μM), 0,5 μL de Taq polimerasa (2,5U/ μL) y 1 μL de DNA molde (10-50 ng). El volumen de la reacción se completaba con agua estéril filtrada de calidad para biología molecular. Las reacciones anidadas se prepararon como se ha descrito anteriormente, excepto por el par de cebadores utilizado. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en los siguientes termocicladores: *Bio-Rad C1000 Thermal Cycler* y *Bio-Rad S1000 Thermal Cycler* (Bio-rad Laboratories) y el *T-Personal Thermal Cycler* (Biometra)

3.3.3 Cuantificación, concentración y purificación del DNA amplificado

La cuantificación de los productos de PCR es necesaria para el análisis posterior de los mismos. Se utilizaron dos metodologías de cuantificación diferentes dependiendo de la precisión requerida en la cuantificación. En primer lugar, para las muestras que se analizaron a través de la elaboración de genotecas y DGGE se utilizó un método electroforético; mientras que, en el caso de las examinadas mediante secuenciación masiva, a través de la plataforma Illumina MiSeq, se utilizó un método fluorométrico de alta precisión.

La cuantificación electroforética se llevó a cabo mediante la visualización de los fragmentos amplificados en geles de agarosa al 1,5%. A los productos de PCR se les añadió tampón de carga (*Bromophenol-Blue*, *Xylene-Cyanol* diluido en glicerol) y posteriormente se cargaron en los pocillos del gel. Flanqueando las muestras se aplicaron marcadores de peso molecular (*Low Mass Ladder*), de concentraciones conocidas. Las condiciones de carrera fueron de 30 minutos a 90V, el gel fue teñido con bromuro de etidio, observado y fotografiado mediante el *Universal Hood II* (Bio-Rad Laboratories). Finalmente, se procedió a determinar la concentración de DNA mediante la utilización del programa Quantity-one© (Bio-Rad Laboratories).

La cuantificación fluorométrica se basa en la utilización de fluoróforos que se intercalan específicamente entre las moléculas de interés, minimizando así los efectos de los contaminantes. Por lo tanto, este método permite una cuantificación de DNA, RNA o proteínas con una alta precisión y sensibilidad. Las muestras se cuantificaron usando el fluorómetro *Qubit 4 Fluorometer* (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunas ocasiones, en función de la calidad de los amplicones obtenidos y del tipo de análisis a realizar, fue necesario purificar y/o concentrar los productos de PCR utilizando kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit *DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research) se utilizó para purificar y concentrar los amplicones obtenidos y el kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) se utilizó para recuperar las bandas del gel de agarosa.

También se utilizaron dos procedimientos para unir y concentrar los productos de PCR. En primer lugar, se emplearon los filtros para centrifuga Amicon® Ultra – 0,5 mL (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. No obstante, en algunas ocasiones la concentración se llevó a cabo mediante precipitación con etanol y acetato sódico. En este caso, se transferían a un único tubo todos los productos de PCR, se añadían 1/10 volúmenes de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, se mezclaba y se incubaba 3 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugaba 60 min. a 14.000 rpm (4°C), se descartaba el sobrenadante y se le añadía 1 ml de etanol al 70%. A continuación, se centrifugaba de nuevo en frío (4°C) durante 5 min. a 12.000 rpm, se eliminaba el sobrenadante y se secaba a 50°C en un bloque térmico. Finalmente, se resuspendía en 35 µl de agua estéril de calidad de biología molecular.

3.3.4 Análisis mediante DGGE

La electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) es una técnica de *fingerprinting* que nos permite separar fragmentos de DNA con la misma longitud (hasta 700pb), pero distinta secuencia¹⁵¹. Esta técnica se basa en la desaceleración de la movilidad de los amplicones en el gel de poliacrilamida a medida que aumenta el gradiente de desnaturización química (elaborado en forma de una mezcla de urea y formamida) debido a la fusión parcial de la doble cadena de DNA. A los fragmentos amplificados mediante PCR se les añade una cola de GC en el extremo 5' que actúa aumentando en gran medida el punto de fusión y por lo tanto haciendo que esta doble cadena no se disocie en DNA de cadena única. Con esta técnica podemos detectar los componentes mayoritarios de la comunidad¹⁵². Todas las DGGEs de este trabajo han sido realizadas con el *Dcode Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad).

El gradiente desnaturizante utilizado depende de las características del DNA amplificado. En nuestro caso se utilizaron gradientes diferentes para muestras de suelo y filosfera teniendo en cuenta los cebadores y la comunidad objeto de estudio. Todas las DGGEs se han realizado usando TAE1X como *buffer* y a 60°C. El tiempo y el voltaje varían dependiendo del origen de la muestra y de la pareja de cebadores utilizada. En la tabla 3.7 se detallan las condiciones de carrera y el gradiente desnaturizante

químico de las DGGEs utilizadas en este trabajo, según los parámetros comentados anteriormente.

Tabla 3.7 Condiciones de carrera (temperatura, tiempo y voltaje) y gradiente desnaturalizante químico utilizados para la realización de los geles en gradiente desnaturalizante (DGGE) dependiendo del del origen de las muestras y la pareja de cebadores utilizados.

Origen de las muestras	Cebadores	Diana	Tiempo (h)	Voltaje (V)	Gradiente (%)
Filosfera	63f-GC/518r	Bacterias	8	100	20-60
	EF4/ITS4-ITS1F-GC/ITS2	Hongos	4	75	15-40
Suelo	341f-GC/907r	Bacterias	16	75	20-70
	EF4/ITS4-ITS1F-GC/ITS2	Hongos	16	75	15-50

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida preparado al menos dos horas antes de empezar la carrera. Para preparar el gel se dispuso de tres tubos Falcon, uno con acrilamida que no presenta agentes desnaturalizantes químicos (0%), y los otros dos con acrilamida que presentaban una mezcla de urea y formamida al porcentaje de desnaturalización de los extremos del gradiente. A los tres tubos se les añadió TEMED y APS como iniciador y catalizador, respectivamente, necesarios para la polimerización de la acrilamida. Finalmente, se agregó el colorante, sólo al tubo con mayor porcentaje de desnaturalización, como control visual de la formación del gradiente. Posteriormente, se procedió a preparar el gel de acrilamida de 1 mm de espesor mediante un formador de gradiente modelo 385 (*Bio-rad Laboratories*) acoplado a una bomba peristáltica Econo Pump Model EP-1 (*Bio-rad Laboratories*) que permitía reproducir de manera fiable el gradiente desnaturalizante químico deseado, y para finalizar se depositaba en la parte superior del gel (zona de apilamiento), el contenido del tubo de acrilamida sin desnaturalizante químico, se insertaba el peine y se dejaba polimerizar dos horas.

La cantidad de DNA cargada en los geles fue de 900 ng por muestra, excepto en las DGGE donde se analizaba el gen del RNA 16S bacteriano de muestras de suelo, donde se cargaron 1500 ng dada la complejidad del patrón de bandas obtenido. Cabe resaltar que, para lograr dicha cantidad de DNA, de calidad, en ocasiones fue necesario aplicar

las estrategias de concentración y purificación descritas en el apartado 3.3.3. A continuación, se conectó el *Dcode Universal Mutation Detection System* (Bio-rad Laboratories) al *Universal Hood II* (Bio-rad Laboratories), el tiempo y al voltaje necesarios para cada una de las muestras descrito en la tabla 3.7. Al acabar la carrera, se procedió a la tinción del gel con bromuro de etidio diluido en agua MilliQ (1:10) durante 30 minutos, seguidamente se pasó a otro recipiente con agua MilliQ durante 30 minutos para limpiar el bromuro de etidio sobrante y finalmente se visualizó y fotografió el gel mediante el *Universal Hood II* (Bio-Rad Laboratories), para su posterior análisis.

Con el objetivo de realizar un análisis taxonómico de las muestras, se recuperaron del gel de acrilamida las bandas más representativas. Se cortaron mediante una hoja de bisturí, se les eliminó el bromuro de etidio, y se resuspendieron en buffer de PCR para su posterior amplificación con los cebadores utilizados previamente. Una vez amplificadas las bandas, la secuenciación fue realizada mediante el método Sanger en un servicio externo (Macrogen, Corea del sur).

3.3.5 Análisis mediante genotecas

Las genotecas o bibliotecas genéticas permiten el análisis de fragmentos de DNA de mayor tamaño que la DGGE (hasta 3000 pares de bases sin tener que purificar el DNA), proporcionando una mayor resolución en la identificación filogenética de los microorganismos que componen las comunidades analizadas, a la vez que nos permite obtener un número más elevado de secuencias. Las parejas de cebadores utilizadas para la amplificación de las muestras procesadas mediante este método analítico fueron 799f-1492r y ITS1F-ITS4r (Tabla 3.5), para bacterias y hongos respectivamente. Una vez amplificadas las muestras, se comprobó la pureza de los productos de PCR en un gel de agarosa, y en el caso de la pareja de cebadores 799r-1490r se extrajo del gel la banda inferior como se detalla en el apartado 3.3.3 (Figura 3.15), ya que la banda superior se corresponde con el cloroplasto¹⁴¹. Después de haber generado y optimizado los amplicones, se utilizó el kit *TOPO® TA Cloning®* (Thermo-Fisher Scientific) como vector con el que se transformaron las células de *Escherichia coli*

químicamente competentes del kit *One Shot*[®] *TOP10* (Thermo-Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células de *E. coli* transformadas se sembraron en placas de LB con kanamicina y x-gal y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El día siguiente se aislaron unas 200 colonias transformadas y con el amplicón introducido en el vector para cada muestra y se incubaron a 37°C, durante 24 horas en placas de 96 pocillos con medio LB líquido suplementado con kanamicina. Después se volvieron a amplificar con las mismas condiciones de las PCRs previas. Finalmente, la secuenciación de los amplicones se realizó en un servicio externo, Macrogen (Corea del sur) mediante secuenciación Sanger.



Figura 3.15. Producto de PCR amplificado con la pareja de cebadores 799r-1492r en el que se distingue la banda de DNA bacteriano de la de cloroplasto. La banda de DNA bacteriano será escindida y utilizada para la elaboración de la genoteca.

3.3.6 Secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq

El sistema Illumina MiSeq utiliza un procedimiento de secuenciación por síntesis, similar al utilizado en la secuenciación Sanger, en el que los cuatro nucleótidos se agregan simultáneamente, junto con la DNA polimerasa, para su incorporación a los fragmentos de DNA objeto de estudio. Los nucleótidos contienen un marcador fluorescente diferente para cada base, además, el grupo 3'-OH está químicamente bloqueado, de modo que cada incorporación para el proceso. Una vez incorporados los nucleótidos se toman las imágenes para ver qué base se ha incorporado. Después el grupo de bloqueo 3' se elimina químicamente para preparar cada cadena para la próxima incorporación mediante DNA polimerasa¹⁵³. La diferencia reside en que en lugar de secuenciar un fragmento de DNA se secuencian millones en paralelo. Para

hacer esto primero se generó una biblioteca de los fragmentos gracias a una PCR puente añadiendo los adaptadores. Estos productos de PCR se cargan en una celda donde se capturan gracias a esos adaptadores y en este momento se produce la amplificación y lectura de las secuencias.

La primera amplificación del proceso de Illumina, en la que se añaden los adaptadores, se realizó en el laboratorio, con unos cebadores diseñados añadiendo el adaptador proporcionado por la empresa que después se encargaría de la secuenciación masiva mediante la plataforma Illumina MiSeq, Servicios Genómicos (Paterna, España).

3.4 Tratamiento bioinformático de los datos

3.4.1 Análisis de los perfiles de DNA obtenidos mediante DGGE

Los análisis de perfiles de DNA se llevaron a cabo utilizando el software InfoQuest™ FP (BioRad Laboratories). Las imágenes utilizadas son las obtenidas mediante el programa Quanty One® (BioRad Laboratories) y exportadas en formato TIFF. Los carriles, correspondientes a cada una de las muestras en los geles, fueron identificados manualmente y posteriormente ayudados por el análisis espectral se eliminó el ruido de fondo. Una vez identificados los carriles se señalaron los marcadores con el fin de normalizar los diferentes geles de un mismo experimento. Las bandas fueron identificadas manualmente. Una vez tratada la imagen, los carriles se exportaron a la base de datos donde se pueden agrupar y comparar. A partir de esta base de datos se puede exportar la matriz binaria o cuantitativa de los carriles, que será utilizada para calcular los índices de diversidad y analizar (semi cuantitativamente) la abundancia de cada taxón identificado.

Los análisis de agrupación también se realizaron mediante el programa InfoQuest™ FP (BioRad Laboratories), usando el coeficiente de Dice y los dendrogramas se obtuvieron mediante el método UPGMA. Estos fueron exportados en formato Newick, para más adelante editarlos con el software FigTree¹⁵⁴.

Los índices de diversidad (Riqueza, *Shannon* y *Equidad*) se obtuvieron a partir de la hoja de cálculo Excel generada de la matriz exportada de InfoQuest™ FP (BioRad Laboratories).

Se utilizó el paquete *Vegan*¹⁵⁵ en el entorno *R*¹⁵⁶ para realizar el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) a partir de la presencia o ausencia de bandas y la intensidad de las mismas, para cada posición en el gel en las matrices cuantitativas exportadas a partir del programa InfoQuest™ FP (BioRad).

3.4.2 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas mediante el método de Sanger, tanto las correspondientes a las genotecas como las pertenecientes a las bandas de DGGE fueron revisadas manualmente, para eliminar secuencias contaminadas y editar bases degeneradas o dudosas; para ello se utilizó el programa *FlinchTV*© (Geospiza). Las secuencias provenientes de los perfiles de DGGE se identificaron mediante la herramienta *BLAST*® del NCBI^{157,158}.

3.4.3 Procesamiento de las secuencias obtenidas a partir de las Genotecas

Una vez editadas las secuencias y dispuestas todas en formato *Fasta*, fueron procesadas mediante el paquete de software *mothur*¹⁵⁹ usando dos procedimientos operacionales estándar que incluyen los siguientes comandos:

Procedimiento operacional de las secuencias en conjunto:

- `summary.seqs`
- `align.seqs`
- `chimera.uchime`
- `remove.seqs`
- `dist.seqs`
- `cluster`
- `bin.seqs`
- `get.oturep`

- `classify.seqs`
- `rarefaction.single`
- `summary.single`

Con esta serie de comandos hemos tratado todas las muestras en su conjunto, viendo la calidad de las secuencias, alineándolas, eliminando las posibles quimeras, separándolas en OTUs con un 3% de diferencia, eligiendo las secuencias representativas, clasificándolas taxonómicamente y obteniendo las curvas de rarefacción y los índices de diversidad.

Para utilizar el comando `align.seqs`, que alinea las secuencias, se necesita una base de datos de referencia alineada. En el caso de las secuencias de bacterias se utilizó la base de datos SILVA, pero para las secuencias de hongos, no se dispone de esta base de datos, por lo tanto, se utilizó el software Mafft¹⁶⁰ para alinearlas externamente y luego se siguió con los comandos para `mothur`.

Para clasificar taxonómicamente las secuencias se utilizaron dos archivos, una plantilla y un archivo de referencias taxonómicas, las bases de referencia utilizadas para la identificación de secuencias fueron, SILVA¹⁶¹ para bacterias y UNITE¹⁶² para hongos.

El comando `rarefaction.single`, permite representar las curvas de rarefacción, que nos indican cuantas secuencias acumuladas son necesarias para la obtención de un nuevo OTU.

Procedimiento operacional de las secuencias por grupos:

- `make.group`
- `make.shared`
- `summary.shared`
- `get.sharedseqs`
- `get.oturep`
- `venn`
- `tree.shared`

Con estos comandos se trataron las muestras por grupos, viendo que secuencias aparecían en uno o más grupos, para poder compararlos entre ellos y dendrogramas.

3.4.4 Procesamiento de las secuencias obtenidas mediante Illumina MiSeq

En este caso, las secuencias no se procesaron manualmente, si no que la limpieza y eliminación de secuencias contaminadas o cortas se integró en el proceso general del paquete de software mothur¹⁵⁹:

Procedimiento operacional estándar para la comprobación y limpieza de las secuencias:

- make.file
- make.contigs
- screen.seqs (maxambig=0, maxlenght=)
- unique.seqs
- count.seqs
- align.seqs
- screen.seqs (start=, end=, maxhomop=8)
- filter.seqs

Con estos comandos se eliminaron secuencias que no tenían la longitud prevista o que no tenían la calidad deseada. También se agruparon las secuencias que eran iguales, para trabajarlas como una única secuencia y procesar un volumen menor de datos.

Procedimiento operacional estándar para la unión en grupos y clasificación filogenética:

- unique.seqs
- pre.cluster
- chimera.vsearch
- remove.seqs
- classify.seqs
- remove.lineage

- summary.tax
- dist.seqs
- cluster
- make.shared
- classify.otu
- phylotype

En este apartado se agruparon las secuencias en OTUs con al menos 97% de similitud, se eliminaron las posibles quimeras, se clasificaron taxonómicamente las secuencias y se eliminaron las que no pertenecían al taxón objeto de estudio. Se hizo también una clasificación filotípica para algunos posteriores análisis.

Procedimiento operacional estándar de Análisis:

- count.groups
- sub.sample
- rarefaction.single
- summary.single
- dist.shared
- pcoa
- nmds
- Amova (Analysis of molecular variance)
- Homova (Homogeneity of molecular variance)
- corr.axes
- get.communitytype
- metastats
- lefse
- venn

- tree.shared

Estos son los análisis de básicos de α y β diversidad que se realizaron con el paquete de software mothur¹⁵⁹ para todos los experimentos.

3.4.5 Estudios de β -diversidad

Para el análisis de las diferencias a nivel de composición taxonómica entre las diferentes muestras estudiadas en cada uno de los experimento realizados, mediante β -diversidad nos hemos servido de diferentes herramientas, además de las descritas en el apartado anterior mediante el paquete de software mothur¹⁵⁹:

LEfse (*Linear discriminant analysis Effect Size*)¹⁶³: Este test no paramétrico incorporado en Mothur permite identificar de forma robusta si hay diferencias significativas a nivel de composición taxonómica entre diferentes grupos, como por ejemplo, entre dos tipos de suelos, o entre diferentes estadios fenológicos. Es decir, determina los rasgos (organismos, clados, OTUs...) que tienen más probabilidades de explicar las diferencias entre clases mediante el acoplamiento de pruebas estándar de significación estadística con pruebas adicionales que codifican la consistencia biológica y la relevancia del efecto.

FAPROTAX: *Functional Annotation of Prokaryotic Taxa*¹⁶⁴ es una base de datos que busca establecer funciones relevantes metabólica o ecológicamente en los clados de procariontas, usando bibliografía de cepas cultivables (Tabla S3.2). FAPROTAX incluye *software* para convertir los perfiles taxonómicos de la comunidad microbiana en perfiles funcionales basados en los taxones identificados.

Microbiome: También se ha utilizado la herramienta microbiome¹⁶⁵ de R, que utiliza la taxonomía y los filotipos obtenidos con mothur, para obtener el posible *core* y los microorganismos que pertenecen a este. Se considera como parte del core el grupo de microorganismos que se encuentran habitualmente dentro del microbioma de un huésped, utilizando la persistencia de la asociación como criterio para seleccionar los microorganismos que potencialmente proporcionan una función crítica dentro del hábitat en el que se encuentran¹⁶⁶. Para cumplir las dos características, persistencia y función crítica, en los análisis posteriores se ha utilizado una prevalencia mínima del 90% y un mínimo de detección del 0.5%.

3.4.6 Herramientas utilizadas para la confección de gráficas

Las figuras han sido elaboradas mediante el pack ggplot2¹⁶⁷ para R¹⁵⁶, el software SigmaPlot 11.0 y el programa Microsoft Excel dependiendo del formato en el que los datos fueron obtenidos. Para la composición de imágenes y figuras se utilizaron los programas Adobe Photoshop CS6 y Adobe Illustrator CS6.

Capítulo 4. El microbioma de la filosfera de peral y
manzano: variaciones a lo largo del desarrollo fenológico
del árbol

La microbiota asociada a la filosfera de las plantas es fundamental para la homeostasis de su huésped^{75,76}, pero también puede ser responsable de enfermedades^{27,168}. El estudio de los microorganismos que constituyen la filosfera puede ayudar a prevenirlas, así como a potenciar poblaciones microbianas que ayuden al crecimiento de la planta, como por ejemplo aportando nutrientes, sintetizando fitohormonas o también biorremediando productos tóxicos. El estudio de las variaciones que experimenta el microbioma de la filosfera a lo largo del desarrollo fenológico de la planta nos puede proporcionar una perspectiva más precisa de en qué momento los microorganismos beneficiosos o causantes de enfermedades son más abundantes y, por lo tanto, poder intervenir de forma eficaz y controlada contribuyendo a la sostenibilidad y a la mejora de la producción agrícola.

En este capítulo se ha realizado un estudio de las poblaciones microbianas que integran la filosfera de dos especies de rosáceas como son *Malus domestica* var *Golden delicious* y *Pyrus communis* var *Passe crassane* y los cambios que estas experimentan en las diferentes fases del ciclo fenológico del árbol. Se han distinguido seis estadios: brotación, prefloración, floración, postfloración, cuajado del fruto y maduración del fruto. Además, se ha investigado si hay diferencias a nivel de composición microbiana entre las dos especies de Rosaceae, así como si se establece un *core* específico que permanezca a lo largo de todo el desarrollo fenológico del árbol. Para la realización de este estudio se han comparado tres aproximaciones metodológicas moleculares diferentes: DGGE, genotecas y secuenciación masiva mediante la plataforma Miseq de Illumina.

4.1 Resultados

4.1.1 Estudio de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol mediante DGGE

La primera aproximación a este estudio se realizó mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Dicha técnica de *fingerprinting* se utilizó porque

permite analizar un gran número de muestras con sus correspondientes réplicas de una manera barata y rápida, y determinar si hay diferencias en la estructura de las comunidades microbianas a través del análisis de los patrones de bandas obtenidos para cada muestra. Además, también permite conocer la afiliación taxonómica de las poblaciones más abundantes. En este caso, se analizaron seis réplicas de cada uno de los seis estadios fenológicos estudiados de peral y manzano. El análisis de las poblaciones bacterianas mediante DGGE fue realizado por Jordi Escolano, investigador del grupo de microbiología ambiental de la UAB, y sus resultados se tendrán en cuenta de cara a la discusión de los resultados obtenidos en esta investigación mediante la confección de genotecas y secuenciación masiva. Por lo tanto, los datos consignados en este apartado serán únicamente los derivados del estudio de las poblaciones fúngicas.

En la figura 4.1 se muestran los perfiles de DGGE correspondientes a las poblaciones fúngicas, así como las bandas recuperadas de los mismos para su posterior secuenciación y análisis taxonómico. A partir de los patrones de bandas obtenidos se calcularon los diferentes índices de diversidad para cada uno de los estadios fenológicos estudiados (Tabla 4.1). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada muestra, el índice de Shannon para estas muestras va desde 0,293 hasta 2,207. La riqueza de especies, valorada a partir del número total de bandas que presenta cada muestra fluctua entre 4 hasta 20. Por último, el rango del índice de equidad oscila hasta 0,211 hasta 0,845. Se han realizado t de student para determinar si hay diferencias significativas entre los índices de diversidad de las dos especies de árboles estudiadas y estos han mostrado diferencias significativas para los tres índices de diversidad analizados, siendo superiores los valores en las muestras provenientes de manzano. Cuando se analizan las diferencias entre los índices de diversidad correspondientes a los diferentes estadios fenológicos, dentro de una misma especie de árbol frutal, se puede observar que en algunos casos las diferencias son significativas tal y como se muestra en la tabla 4.2. Podemos observar diferencias significativas entre los diferentes estadios en ambas especies, pero el patrón de cambios de diversidad de la comunidad fúngica es diferente dependiendo de la especie

estudiada. Además, el manzano presenta más diferencias entre sus estadios fenológicos. El análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) (figura S4.1) realizado con el módulo Vegan de R a partir del análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante Infoquest muestra que algunos de los estadios se solapan, esto estaría apoyado por la falta de diferencias significativas entre ellos. No obstante, podemos advertir cómo algunos de los estados son claramente distintos al resto, como por ejemplo las fases de brotación y de maduración del fruto en manzano y la postfloración en peral.

La afiliación filogenética de las bandas recuperadas de los geles de DGGE, muestra que estas pertenecen a dos filos fúngicos, Ascomycota y Basidiomycota, distribuyéndose en 4 y 3 clases respectivamente (Tablas S4.1 y S4.2). La clase Eurotiomycetes del filo Ascomycota y la clase Agaricomycetes del filo Basidiomycota están presentes solo en la filosfera del peral, mientras que la clase Microbotryomycetes es exclusiva de manzano. Este análisis muestra que hay géneros característicos de cada una de las filosferas. En manzano, serían *Cladosporium cucumerinum*, *Pseudocercospora humuli* y *Podosphaera leucotricha* del filo Ascomycota, y *Rhodotorula* spp, *Cryptococcus tephrensis*, *Fellomyces* spp, *Filobasidium floriforme* y *Kockovaella barringtoniae* del filo Basidiomycota. En peral, son *Herpotrichia parasítica*, *Lophiostoma* spp, *Paraconiothyrium brasiliense*, *Phialophora* spp y *Dasyscyphella longistipitata* del filo Ascomycota.

La abundancia relativa de cada uno de los taxones, representados en las diferentes bandas posicionadas a lo largo del perfil, se ha calculado a partir de la intensidad relativa de las mismas respecto a la intensidad total. Este análisis nos ha permitido identificar un 95,26% de la intensidad total en las DGGEs de manzano y un 93,11% en las de peral si sumamos la intensidad de todas las bandas discretas que se han podido recuperar, secuenciar y determinar su afiliación filogenética. La tabla S4.3 muestra los porcentajes de cada taxón identificado, siendo el filo Ascomycota el más abundante en ambas filosferas (61-67%) comparado con el Basidiomycota (37-28%). Estos datos de intensidad relativa muestran que la clase Leotiomycetes es significativamente ($p < 0,05$) más abundante en la filosfera de peral, mientras que en el caso del manzano podemos

establecer que la especie *Cryptococcus macerans* perteneciente a la clase Tremellonycetes es la que está presente en una proporción significativamente superior. Los datos obtenidos respecto a la cuantificación relativa permiten, además, observar cómo varían algunos de los taxones a lo largo del desarrollo fenológico del árbol, por ejemplo, en las muestras de manzano *Filobasidium floriforme*, pasa de un 0% en brotación a un 20% en maduración del fruto (Tabla S4.3).

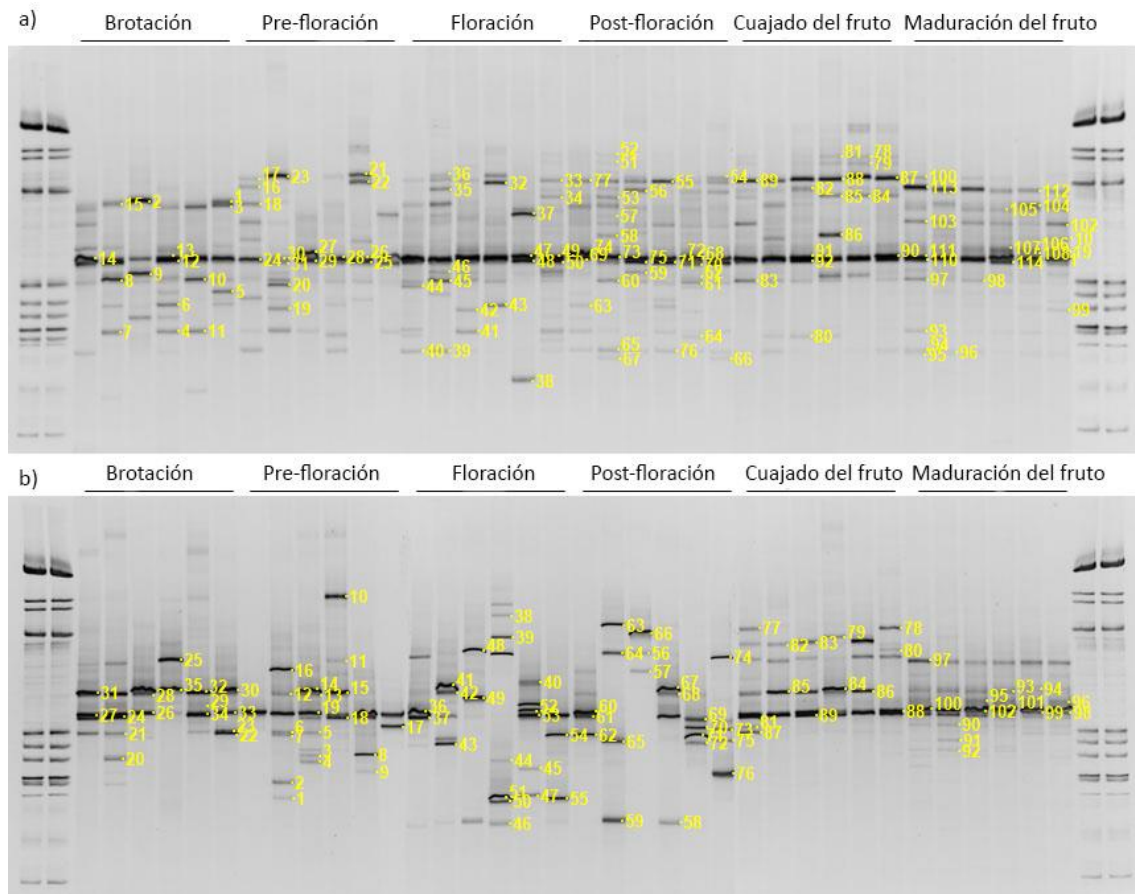


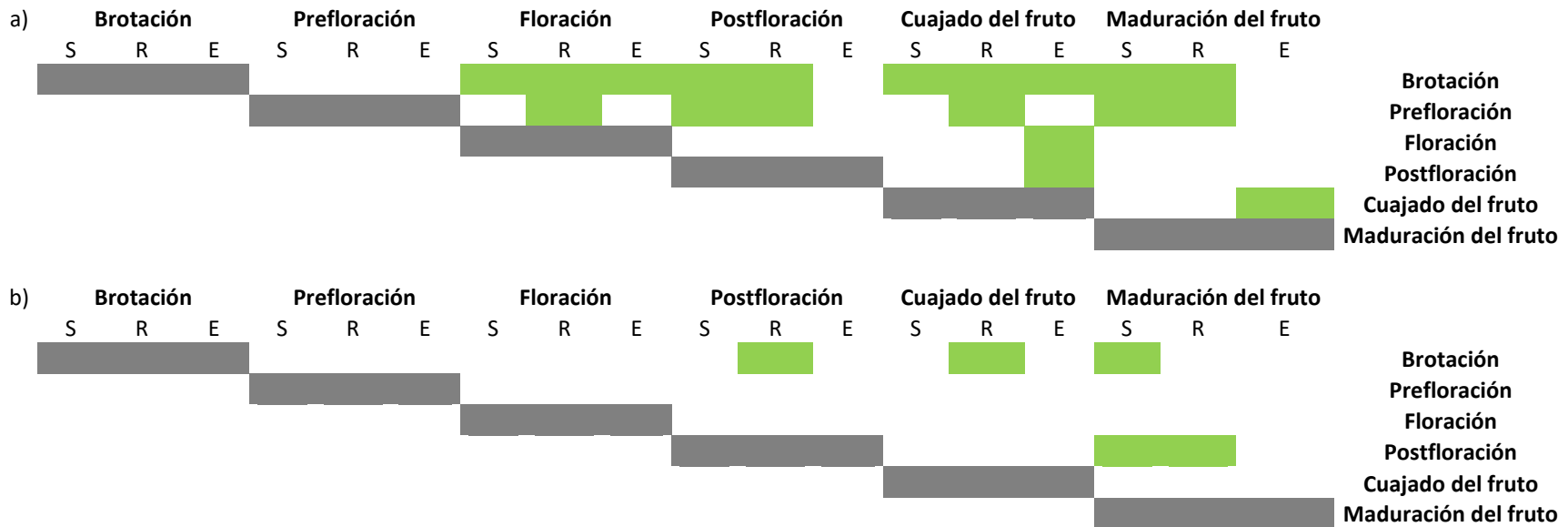
Figura 4.1 Patrones de bandas de DGGE de las poblaciones fúngicas asociadas a la filosfera de manzano (a) y peral (b), correspondientes a las 6 réplicas de cada estadio fenológico analizado, obtenidos a partir de la amplificación de la región ITS del genoma fúngico. Los números se corresponden a las bandas recuperadas.

Tabla 4.1 Índices de diversidad obtenidos a partir de los perfiles de DGGE de los fragmentos de la región ITS del genoma fúngico amplificadas a partir del DNA de las muestras pertenecientes a los diferentes estadios fenológicos de peral y manzano.

Árbol	Estado	Shannon*	Riqueza*	Equidad*
Manzano	Brotación	1,611 ±0,182	8,333 ±1,862	0,767 ±0,028
	Prefloración	1,570 ±0,401	9,500 ±2,258	0,696 ±0,109
	Floración	1,946 ±0,231	14,667 ±3,983	0,735 ±0,017
	Postfloración	1,988 ±0,187	15,833 ±1,722	0,720 ±0,048
	Cuajado del fruto	1,839 ±0,045	15,667 ±1,862	0,671 ±0,022
	Maduración del fruto	1,974 ±0,161	14,500 ±1,761	0,739 ±0,040
Peral	Brotación	1,526 ±0,259	11,167 ±1,169	0,633 ±0,101
	Prefloración	1,315 ±0,644	10,167 ±5,269	0,570 ±0,184
	Floración	1,545 ±0,305	9,833 ±2,562	0,686 ±0,082
	Postfloración	1,402 ±0,292	7,833 ±2,317	0,691 ±0,034
	Cuajado del fruto	1,534 ±0,255	8,167 ±1,941	0,738 ±0,085
	Maduración del fruto	1,808 ±0,071	12,500 ±1,517	0,718 ±0,024

* Media ±desviación estandard realizada a partir de las 6 réplicas de cada estado.

Tabla 4.2 Resumen de los resultados de contraste de medias, mediante la prueba t de *Student*, correspondientes a los índices de diversidad de la filosfera de manzano (*Malus domestica*) (a) y peral (*Pyrus communis*) (b) obtenidos para cada uno de los estadios fenológicos estudiados. El fondo verde indica que las diferencias son significativas $p < 0,05$ S: Índice de Shannon, R: Riqueza, E: Equidad o uniformidad de las especies.



4.1.2 Estudio de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol mediante la confección de genotecas

El análisis mediante DGGE ha puesto de manifiesto que hay diferencias significativas entre la microbiota asociada a la filosfera de las dos especies de árbol estudiadas, además de diferencias también entre algunos estadios fenológicos. Para profundizar en la diversidad taxonómica se ha realizado el análisis de las mismas muestras mediante la elaboración de genotecas, una técnica que nos permitirá conocer la taxonomía de los miembros menos abundantes de las comunidades bacterianas y fúngicas. Para hacer estas genotecas se unieron los productos de PCR de las 6 réplicas y se obtuvo una genoteca para cada estadio fenológico. Se realizaron dos bibliotecas de clones para cada estado fenológico, una con productos de PCR amplificados con cebadores para bacterias y otra con cebadores específicos de hongos.

Bacterioma

El estudio del bacterioma se ha realizado a partir del análisis de 1759 clones, obtenidos después de descartar quimeras y posibles contaminaciones. La proporción de los mismos que corresponde a cada uno de los estados fenológicos estudiados se muestra en la tabla 4.3. La cobertura de la biblioteca global de clones ha sido de un 89,7%; no obstante, cuando dicho cálculo se realiza para el conjunto de clones de cada estadio fenológico por separado, el estadio de floración de peral es el que presenta la cobertura más baja (63,6%) y la más alta (98,6%) corresponde al cuajado del fruto de manzano. Como se puede observar en la tabla 4.3, los índices de diversidad son mayores en el caso de las muestras de peral en comparación con los obtenidos para las muestras de manzano; no obstante, estas diferencias no son estadísticamente significativas (datos no mostrados). Ahora bien, cuando se comparan los índices de Shannon y de riqueza de especies obtenidos a partir de los perfiles de DGGE y de las genotecas (datos no mostrados), los correspondientes a estas últimas muestran una α -diversidad significativamente superior ($p < 0,05$).

En la figura S4.2 están representadas las curvas de rarefacción, el número de secuencias analizadas en función del número de OTUs observados en cada muestra, como se puede apreciar estas se encuentran en su mayoría cerca de la asíntota, corroborando el alto porcentaje de cobertura de las genotecas confeccionadas. El criterio para establecer los OTUs ha sido el de que la disimilitud entre las secuencias sea inferior al 3%.

Con el objetivo de determinar la similitud entre las muestras analizadas se han elaborado dendrogramas a partir de las secuencias de las genotecas (Figura S4.3). En ambos casos, filosfera de peral y manzano, se establecen dos grupos diferenciados que, aunque no son iguales para ambas especies vegetales, agrupan en primer lugar el estadio inicial (brotación) con el estadio final (maduración del fruto) y un segundo bloque correspondiente a los estadios intermedios. Se ha de resaltar que estos se agrupan de distinta manera dependiendo del árbol frutal. Con el propósito de determinar que parámetro tiene más trascendencia, la especie vegetal o el estado fenológico del árbol se ha elaborado un dendrograma con las 12 muestras analizadas en conjunto (Figura 4.2). El resultado obtenido muestra que las fases iniciales y finales del ciclo fenológico (brotación, prefloración y maduración del fruto) quedan agrupadas, en tanto que las fases intermedias del ciclo (floración, postfloración y cuajado del fruto) constituyen otro *cluster*.

De los 311 OTUs obtenidos a partir del total de secuencias validadas, 100 son únicos de la filosfera de manzano, 156 de peral y únicamente 55 aparecen en ambas filosferas los cuales pertenecientes a 5 filos (Tabla S4.4).

Tabla 4.3 Número de clones bacterianos obtenidos a partir de la elaboración de genotecas para cada una de las muestras de la filosfera de manzano y peral y su α -diversidad.

Árbol	Estado	Clones	OTUs	Cobertura (%)	Shannon	Chao
Manzano	Brotación	119	40	81,5	3,2±0,2	69±19
	Prefloración	154	55	82,5	3,4±0,2	80±15
	Floración	152	41	84,6	2,5±0,3	65±28
	Postfloración	147	45	81,1	2,7±0,3	80±39
	Cuajado del fruto	139	7	98,6	1,1±0,2	7±3
	Maduración del fruto	85	19	88,2	2,3±0,2	30±24
	Total		801	152	90,5	3,7±0,2
Peral	Brotación	168	42	91,7	3,2±0,2	61±13
	Prefloración	182	85	70,3	4,0±0,2	174±46
	Floración	165	88	63,6	4,2±0,2	249±85
	Postfloración	153	66	69,9	3,4±0,2	181±65
	Cuajado del fruto	144	17	92,4	1,5±0,2	31±10
	Maduración del fruto	151	24	90,1	1,9±0,2	77±38
	Total		963	210	86,5	4,2±0,1
Total		1764	311	89,7	4,2±0,1	751±198

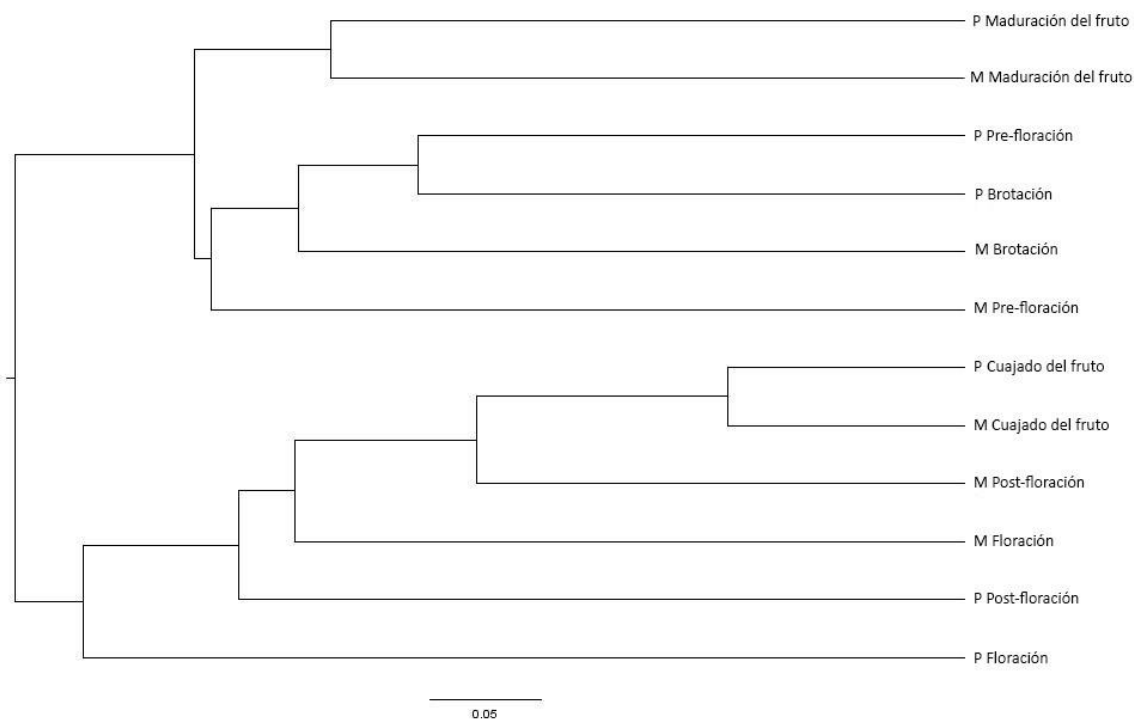


Figura 4.2 Dendrograma obtenido a partir de los clones pertenecientes a las genotecas del bacterioma, aplicando el índice de similitud Bray-Curtis y el método de agrupación jerárquica "unweighted pair-group method" (UPGMA). M: *Malus domestica*, P: *Pyrus communis*. La barra indica el % de similitud.

Los clones están distribuidos en 13 filos (Tabla 4.4), que, ordenados de mayor a menor según su abundancia, son los siguientes: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Deinococcus-Thermus, Actinobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, FBP (Abditibacteriota), Saccharibacteria, Acidobacteria, Armatimonadetes, Fibrobacteres, y Verrucomicrobia y 1 clon que no ha sido posible clasificar. Armatimonadetes está presente solo en la filosfera de peral, en cambio, Fibrobacteres y Verrucomicrobia, con un único clon identificado, solamente se detectan en la filosfera del manzano. Los análisis estadísticos mediante la prueba *t de student* no han mostrado diferencias significativas cuando se comparan los filos presentes en la filosfera de ambos árboles. No obstante, el análisis estadístico comparando los estados de brotación, prefloración y maduración del fruto respecto de floración, postfloración y cuajado del fruto (según la agrupación obtenida en el dendrograma de la Figura 4.2), permite observar que solo el filo Bacteroidetes presenta diferencias significativas, siendo más abundante en el *cluster* correspondiente al inicio y final del ciclo fenológico. En cuanto a filos las Acidobacterias, FBP (Abditibacteriota) y Fibrobacteres solo están presentes en las fases intermedias del ciclo fenológico, mientras que los filos Saccharibacteria y Verrucomicrobia sólo se detectan al inicio y final del mismo.

En la tabla 4.5 se muestran los taxones que poseen más de un 1% de abundancia y su afiliación filogenética, ordenados de más a menos abundante. Podemos observar que estos pertenecen únicamente a 4 filos. Del mismo modo que para los filos, la comparación a nivel de familia y género entre ambas filosferas no presentan muchas diferencias significativas (*t de student* $p < 0,05$); éstas solo las exhiben cuatro géneros, *Pseudomonas* y *Enterobacter* en los estadios intermedios y, *Sphingomonas* y *Hymenobacter* en los estadios de brotación/prefloración/maduración del fruto. Cabe resaltar el género *Buchnera* que solo está presente en la filosfera del peral y únicamente en las fases intermedias del ciclo fenológico y no en el *cluster* correspondiente al inicio y final.

Tabla 4.4 Número de clones asociados a cada filo bacteriano de la filosfera de peral y manzano para cada uno los estados fenológicos obtenidos mediante genotecas.

Filo	Total	Manzano [^]					
		B	E	F	O	Q	L
Acidobacteria	3	0	0	1	0	0	0
Actinobacteria	29	1	7	1	10	0	0
Armatimonadetes	2	0	0	0	0	0	0
Bacteria sin clasificar	1	1	0	0	0	0	0
Bacteroidetes*	289	42	28	14	8	3	28
Chloroflexi	17	0	3	1	0	0	1
Deinococcus-Thermus	56	4	2	3	2	0	5
FBP	4	0	0	1	1	0	0
Fibrobacteres	1	0	0	0	1	0	0
Firmicutes	70	1	11	7	6	0	2
Gemmatimonadetes	12	2	2	0	2	0	0
Proteobacteria	1270	67	101	128	118	136	49
Saccharibacteria	4	1	0	0	0	0	0
Verrucomicrobia	1	0	0	0	0	0	0

Filo	Total	Peral [^]					
		B	E	F	O	Q	L
Acidobacteria	3	0	0	2	0	0	0
Actinobacteria	29	2	3	1	3	0	1
Armatimonadetes	2	0	0	1	0	0	1
Bacteria sin clasificar	1	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes*	289	57	42	36	13	5	13
Chloroflexi	17	2	2	4	2	2	0
Deinococcus-Thermus	56	9	9	13	6	1	2
FBP*	4	0	0	1	1	0	0
Fibrobacteres	1	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	70	0	8	14	17	1	3
Gemmatimonadetes	12	0	1	1	2	1	1
Proteobacteria	1270	96	115	88	108	134	130
Saccharibacteria	4	1	2	0	0	0	0
Verrucomicrobia	1	1	0	0	0	0	0

*: Diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar los estadios intermedios del ciclo fenológico (floración, postfloración y cuajado del fruto), con los de inicio (brotación y prefloración) y final (maduración del fruto).

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano, B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

Tabla 4.5 Número de clones asociados a género con al menos un 1% de abundancia, de las muestras de la filosfera de peral y manzano obtenidos mediante genotecas.

Filo	Género ⁺	Total (%)	Manzano [^]					
			B	E	F	O	Q	L
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> *	14,6	0	3	70	43	43	0
Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	13,5	10	46	5	5	0	31
Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> *	11,2	20	16	11	11	14	13
Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	10,7	0	0	7	36	74	0
Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i> *	10,0	25	16	9	1	0	28
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	2,8	3	2	2	2	0	5
Proteobacteria	Comamonadaceae	2,4	13	0	1	2	0	0
Proteobacteria	<i>Massilia</i>	1,9	4	0	2	1	0	2
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	1,8	1	4	0	0	0	1
Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	1,6	12	1	1	1	0	0
Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> *	1,6	0	0	3	0	4	0
Proteobacteria	Rhizobiales	1,6	1	4	0	5	0	1
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	1,5	0	1	0	0	0	0
Proteobacteria	<i>Escherichia</i>	1,4	3	5	1	0	0	0
Bacteroidetes	Sphingobacteriaceae	1,3	2	1	1	0	0	0
Proteobacteria	<i>Buchnera</i>	1,0	0	0	16	2	0	0
Proteobacteria	<i>Roseomonas</i>	1,0	2	3	2	1	0	0

Filo	Género ⁺	Total (%)	Peral [^]					
			B	E	F	O	Q	L
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> *	14,6	2	5	2	41	48	0
Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	13,5	23	11	9	7	1	91
Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> *	11,2	23	30	16	10	2	32
Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	10,7	0	3	0	2	67	0
Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i> *	10,0	38	23	15	7	5	9
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	2,8	9	9	12	5	0	1
Proteobacteria	Comamonadaceae	2,4	15	7	4	1	0	0
Proteobacteria	<i>Massilia</i>	1,9	9	8	4	2	0	1
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	1,8	5	9	6	4	0	1
Bacteroidetes	<i>Spirosoma</i>	1,6	4	7	2	0	0	0
Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> *	1,6	0	1	4	4	12	0
Proteobacteria	Rhizobiales	1,6	0	3	14	0	0	0
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	1,5	0	1	11	14	0	0
Proteobacteria	<i>Escherichia</i>	1,4	6	2	7	1	0	0
Bacteroidetes	Sphingobacteriaceae	1,3	10	4	3	2	0	0
Proteobacteria	<i>Buchnera</i>	1,0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	<i>Roseomonas</i>	1,0	1	5	3	0	0	0

*: Diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar los estadios intermedios con los de inicio y final.

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

La herramienta Microbiome para R permite establecer el denominado *core*, y en este caso se ha utilizado para determinar los taxones prevalentes del bacterioma de la filosfera de una determinada especie vegetal. Para su análisis, se ha utilizado una prevalencia en las diferentes muestras del 90% y un mínimo de detección del 0,5%, como se ha definido en el apartado de materiales y métodos. El *core* conjunto de todas las muestras analizadas de ambos árboles frutales y de todos los estadios está compuesto por 2 géneros del filo Proteobacteria, *Methylobacterium* y *Sphingomonas* (tabla 4.6). No ha sido posible establecer un *core* para la filosfera del manzano y el correspondiente a la filosfera de peral es idéntico al global. En el *core* correspondiente al cluster asociado a los estadios iniciales y final del ciclo fenológico es característico el género *Hymenobacter*, perteneciente al filo Bacteroidetes. Por otro lado, el *core* del cluster constituido por los estados intermedios del ciclo presenta como elementos diferenciales dos taxones, la familia Enterobacteriaceae y *Pseudomonas*, pero no presentan los dos géneros del *core* global

Tabla 4.6 Core obtenido a partir de los clones pertenecientes a las genotecas del bacterioma global de todas las muestras del bacterioma de la filosfera y de las diferentes variables estudiadas (especie vegetal y de los grupos fenológicos establecidos).

OTU	Phyllum	Genero ⁺	Global [^]	Inicio y final [^]	Intermedio [^]	Manzano [^]	Peral [^]
Otu005	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>		■			
Otu002	Proteobacteria	Enterobacteriaceae			■		
Otu003	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>		■			
Otu006	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	■				■
Otu001	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>			■		
Otu004	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	■	■			■
Otu009	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	■	■			■

[^]Inicio y final: Brotación, prefloración y maduración del fruto. Intermedio: floración, postfloración y cuajado del fruto.

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

Micobioma

En el análisis de la diversidad fúngica de la filosfera mediante la elaboración de genotecas se han obtenido 1951 clones. En la tabla 4.7 se detalla cómo se distribuyen en los distintos estados fenológicos y para cada especie de árbol estudiado. Los índices

de Shannon (2,14-3,75) y riqueza (28-65) son significativamente ($p < 0,05$) más altos en este caso que para las mismas muestras analizadas mediante DGGE (tabla 4.1). No obstante, no hay diferencias significativas entre los índices de diversidad cuando comparamos ambas especies de árboles. La cobertura de las genotecas para las distintas muestras oscila entre el 69,93% y el 92,48%. En la figura S4.4 se muestran las curvas de rarefacción correspondientes a los diferentes estadios del ciclo fenológico del árbol, donde se puede observar que las curvas correspondientes a los estadios de brotación de manzano y postfloración de peral, son las que menos se acercan a la asíntota, además de ser las que menor cobertura presentan, 69,93% y 75,66%, respectivamente.

Tabla 4.7 Número de clones fúngicos obtenidos a partir de la elaboración de genotecas pertenecientes a la filosfera en cada uno de los estadios fenológicos y su α -diversidad obtenidos mediante genotecas.

Árbol	Estado	Clones	OTUs	Cobertura (%)	Shannon	Chao
Manzano	Brotación	153	65	69,93	3,75±0,2	324±161
	Prefloración	164	42	86,59	3,06±0,2	80±25
	Floración	166	39	88,55	2,93±0,2	60±14
	Postfloración	172	40	86,63	2,42±0,2	103±43
	Cuajado del fruto	166	43	84,94	2,32±0,2	70±17
	Maduración del fruto	170	39	89,41	2,84±0,2	54±10
	Total	991	179	89,00	3,75±0,1	446±114
Peral	Brotación	159	32	88,05	2,43±0,2	66±14
	Prefloración	133	28	92,48	2,67±0,2	42±10
	Floración	163	44	82,21	2,56±0,2	89±28
	Postfloración	152	51	75,66	2,94±0,2	162±68
	Cuajado del fruto	180	30	91,67	2,26±0,2	48±13
	Maduración del fruto	173	32	90,75	2,14±0,2	49±12
	Total	960	144	91,04	3,07±0,1	302±70
	Total	1951	275	91,34	3,54±0,1	639±130

Las figuras 4.3 y S4.5 muestran los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de *cluster* a partir de la elaboración de genotecas fúngicas. Se puede observar que la agrupación obtenida no responde ni a la especie vegetal, ni al estadio fenológico, como sí sucedía con los resultados de las genotecas bacterianas (Figura 4.2). Estos resultados están de acuerdo con la heterogeneidad observada al analizar los resultados de perfiles de DGGEs mediante NMDS (Figura S4.1). De los 275 OTUs identificados a partir del total de secuencias, 137 son únicos de manzano, 95 de peral y

únicamente 43 aparecen en ambos árboles frutales. Los 43 OTUs compartidos pertenecen a 30 taxones, que a su vez están afiliados a los filos Ascomycota y Basidiomycota (Tabla S.6).

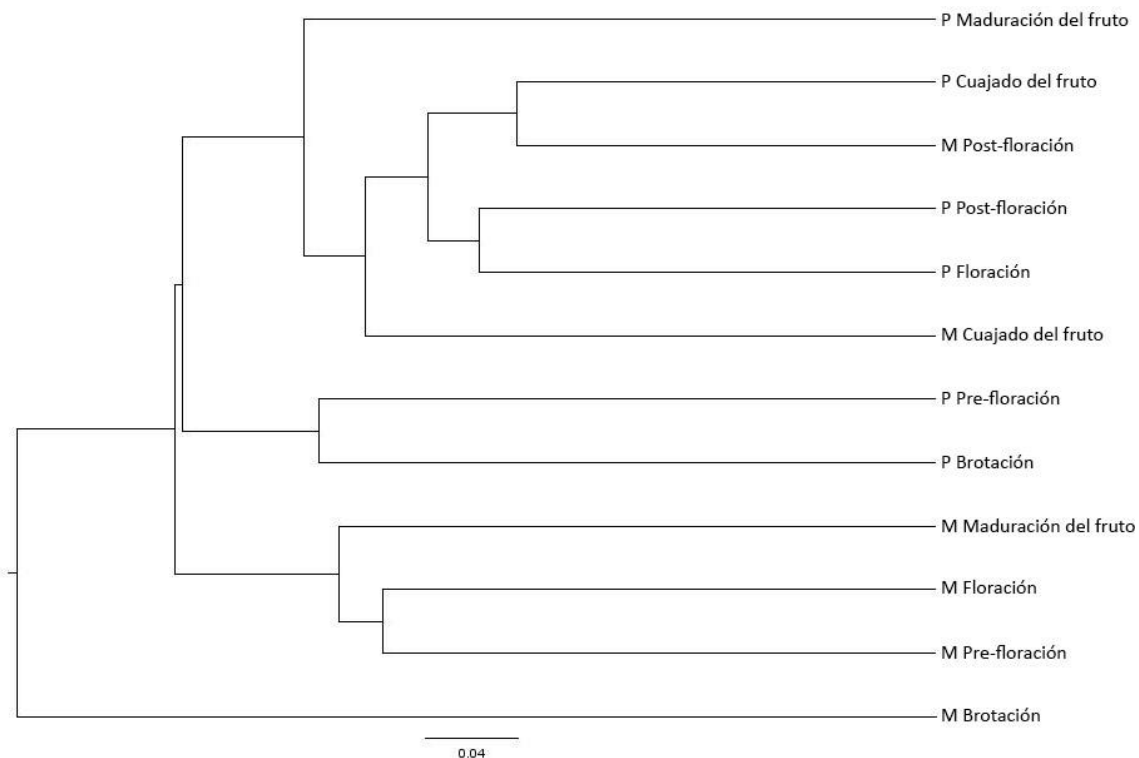


Figura 4.3 Dendrograma obtenido a partir de los clones pertenecientes a las genotecas del microbioma, utilizando el índice de similitud Bray-Curtis y basado en el método de agrupación jerárquica "unweighted pair-group method" (UPGMA). M: *Malus domestica*, P: *Pyrus communis*. La barra indica el % de similitud.

La distribución de los clones en cada uno de los estados fenológicos y para cada especie de árbol frutal se muestra en la tabla S4.7. Ambos filos incluyen taxones representados por más de un 1% del total de clones, en concreto 15 (Tabla 4.8), cabe resaltar que ninguno de los taxones exhibía diferencias significativas ($p < 0,05$) en el número de clones, cuando comparábamos los microbiomas de la filosfera de las dos especies vegetales estudiadas. Dos de las especies identificadas únicamente se

detectaron en las muestras de manzano, *Kalmanozyma fusiformata* y *Neosetophoma clematidis*.

Tabla 4.8 Número de clones obtenidos a partir de genoteca asociados a cada género con al menos un 1% de abundancia respecto al total de clones, de las muestras del micobioma de la filosfera en los diferentes estados fenológicos.

Filo	Género ⁺	Total (%)	Manzano [^]					
			B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	<i>Cladosporium sp</i>	33,5	13	20	38	85	71	44
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma sp</i>	7,3	10	10	22	11	33	5
Ascomycota	<i>Alternaria sp</i>	7,2	12	22	9	7	9	28
Ascomycota	Dothideomycetes	6,6	3	13	11	17	9	12
Basidiomycota	<i>Kalmanozyma fusiformata</i>	5,2	15	33	19	12	0	22
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma tephrens</i>	4,9	1	0	2	3	0	0
Hongos sin clasificar	Hongos sin clasificar	2,7	3	0	0	3	7	6
Ascomycota	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	2,6	2	5	3	0	0	4
Ascomycota	<i>Aureobasidium proteae</i>	2,3	2	1	10	1	1	1
Basidiomycota	Sporidiobolaceae	2,0	0	4	0	6	0	0
Ascomycota	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	1,7	15	8	4	1	0	1
Ascomycota	Capnodiales	1,5	0	0	2	5	12	1
Ascomycota	<i>Tumularia sp</i>	1,3	4	4	11	0	0	2
Ascomycota	<i>Ostropales sp</i>	1,2	5	1	0	0	0	0
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	1,2	2	0	2	0	0	0
Ascomycota	<i>Neosetophoma clematidis</i>	1,0	9	3	3	2	0	2

Filo	Género ⁺	Total (%)	Peral [^]					
			B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	<i>Cladosporium sp</i>	33,5	48	39	71	53	76	95
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma sp</i>	7,3	9	4	5	10	24	0
Ascomycota	<i>Alternaria sp</i>	7,2	1	4	8	20	6	15
Ascomycota	Dothideomycetes	6,6	1	7	18	16	14	7
Basidiomycota	<i>Kalmanozyma fusiformata</i>	5,2	0	0	0	0	0	0
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma tephrens</i>	4,9	41	15	12	11	9	1
Hongos sin clasificar	Hongos sin clasificar	2,7	10	6	4	1	5	7
Ascomycota	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	2,6	1	24	0	1	1	10
Ascomycota	<i>Aureobasidium proteae</i>	2,3	17	3	0	4	3	1
Basidiomycota	Sporidiobolaceae	2,0	0	0	2	0	27	0
Ascomycota	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	1,7	1	3	0	0	0	0
Ascomycota	Capnodiales	1,5	0	4	0	2	2	1
Ascomycota	<i>Tumularia sp</i>	1,3	1	4	0	0	0	0
Ascomycota	<i>Ostropales sp</i>	1,2	0	8	9	1	0	0
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	1,2	8	3	2	3	3	0
Ascomycota	<i>Neosetophoma clematidis</i>	1,0	0	0	0	0	0	0

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

El *core* del microbioma, se ha analizado solamente para el total de muestras y para cada uno de los árboles frutales por separado, debido a la inexistencia de un claro patrón de los estadios fenológicos. El *core* total está constituido por 5 taxones, 4 Ascomycota (*Alternaria spp*, *Aureobasidium proteae*, *Cladosporium spp* y Dothideomycetes) y un Basidiomycota, *Vishniacozyma spp*. El *core* de manzano es igual al total, sin embargo, en el de peral no aparece *Aureobasidium proteae* ni Dothideomycetes y la especie de *Vishniacozyma* se corresponde a *V. tephrensis*.

Tabla 4.9 *Core* global y para cada especie vegetal de todas las muestras del microbioma de la filosfera analizadas a partir de la construcción de genotecas.

OTU	Filo	Especie	Global	Manzano	Peral
Otu003	Ascomycota	<i>Alternaria spp</i>	■	■	■
Otu008		<i>Aureobasidium proteae</i>	■	■	■
Otu001		<i>Cladosporium spp</i>	■	■	■
Otu006		Dothideomycetes	■	■	■
Otu002	Basidiomycota	<i>Vishniacozyma spp</i>	■	■	■
Otu004		<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	■	■	■

4.1.3 Estudio de la diversidad microbiana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol mediante Secuenciación masiva: Illumina MiSeq

Las técnicas de secuenciación masiva generan una mayor cantidad de secuencias, por lo tanto, una mayor profundidad taxonómica. En este apartado se ha utilizado la técnica Illumina MiSeq para estudiar las muestras de la filosfera de *Pyrus communis*. Dado que las anteriores tecnologías mostraron que el ciclo fenológico era responsable de la mayoría de diferencias entre las muestras se analizó solo las comunidades microbianas de una de las especies vegetales. Se escogió el caso particular de *Pyrus communis* var Passe Crassane debido a que no se ha podido caracterizar el *core* de *Malus domestica* var Golden Delicious.

Se ha realizado la secuenciación masiva de 6 muestras pertenecientes a cada uno de los estados fenológicos estudiados. Al igual que en el estudio realizado a partir de la confección de genotecas se han unido los productos de PCR de las 6 réplicas correspondientes a cada uno de los estados fenológicos.

Comunidad bacteriana

La secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq generó 3.363.927 de secuencias, que una vez procesadas y reducidos los errores de PCR y secuenciación, y eliminadas las 450 secuencias pertenecientes a Archaea, el número de secuencias con el que se trabajó, fue 2.076.531 (Tabla 4.10a). La cobertura mínima obtenida fue de 0,986, y los índices de Shannon fueron similares a los obtenidos a partir del análisis mediante genotecas los cuales oscilaban entre 2,75 y 4,89. No se observaron diferencias significativas entre los coeficientes obtenidos para las diferentes muestras. Para la realización de los análisis de β -diversidad era necesario trabajar con el mismo número de secuencias por muestra, para ello se redujo el valor de todas ellas hasta 277.457 (valor de la muestra que presentaba menor número de secuencias). En la tabla 4.10b se muestra que tanto las coberturas, como los índices de diversidad de las secuencias seleccionadas para realizar los estudios de β -diversidad apenas varían respecto a los valores de la tabla 4.10a. Como puede observarse en la Figura S4.6 las curvas de rarefacción de las muestras están cerca de ser asintóticas.

El dendrograma (Figura 4.4) obtenido a partir del análisis de los resultados muestra el agrupamiento de las muestras basado en los OTUs y la abundancia de estos. Se observa una agrupación de los estadios intermedios del ciclo fenológico (floración, postfloración y cuajado del fruto), como en el caso de las genotecas, así como la agrupación de las fases de brotación y prefloración, pero ambos grupos están separados del estadio final de maduración del fruto.

Tabla 4.10 Número de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva: Illumina MiSeq, y α -diversidad para cada una de las muestras del bacterioma de la filosfera del peral. a) Secuencias totales
b) Secuencias utilizadas para los estudios de β -diversidad.

a)						
Muestra	Lecturas iniciales	Lecturas procesadas	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
Brotación	538.733	333.089	2.884	0,994	2,75	10.877,80
Prefloración	556.500	360.433	5.216	0,991	3,77	13.788,12
Floración	584.696	390.260	5.282	0,992	4,89	16.305,37
Postfloración	590.454	277.457	6.526	0,986	4,50	15.724,31
Cuajado del fruto	550.582	372.888	4.388	0,993	4,02	13.813,13
Maduración del fruto	542.962	342.404	3.333	0,993	3,66	10.718,63
b)						
Muestra	Lecturas procesadas	Lecturas subgrupo	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
Brotación	333.089	277.457	2.529	0,993	2,75	9.385,89
Prefloración	360.433	277.457	4.463	0,990	3,76	11.998,13
Floración	390.260	277.457	4.342	0,992	4,88	12.129,82
Postfloración	277.457	277.457	2.894	0,993	3,66	9.121,98
Cuajado del fruto	372.888	277.457	6.526	0,986	4,50	15.724,31
Maduración del fruto	342.404	277.457	3.714	0,992	4,02	10.429,67

Para corroborar la existencia de diferencias entre los *cluster* mostrados en la figura 4.4, se han realizado sendos test Amova y Homova. Para el test Amova se obtuvieron diferencias significativas al comparar los estados iniciales (brotación y prefloración) y final (maduración del fruto) del ciclo fenológico con las etapas intermedias (floración, postfloración y cuajado del fruto). Dichos resultados son similares a los obtenidos a través de la confección de genotecas (Fig. 4.2). Estas variaciones que experimenta el bacterioma a lo largo de las distintas fases del ciclo fenológico se ajustan a un modelo cíclico que denominaremos diseño circular. Sin embargo, mediante el test Homova, se han obtenido diferencias significativas cuando se han establecido tres grupos, estados iniciales (brotación y prefloración); estados intermedios (floración, postfloración y cuajado del fruto) y, por último, un grupo constituido solo por el estadio final de maduración del fruto. En este caso se denominó diseño de tres *clusters*. Ambos

diseños serán utilizados para estudiar las variaciones de la microbiota bacteriana a lo largo del desarrollo fenológico del árbol, la β diversidad.

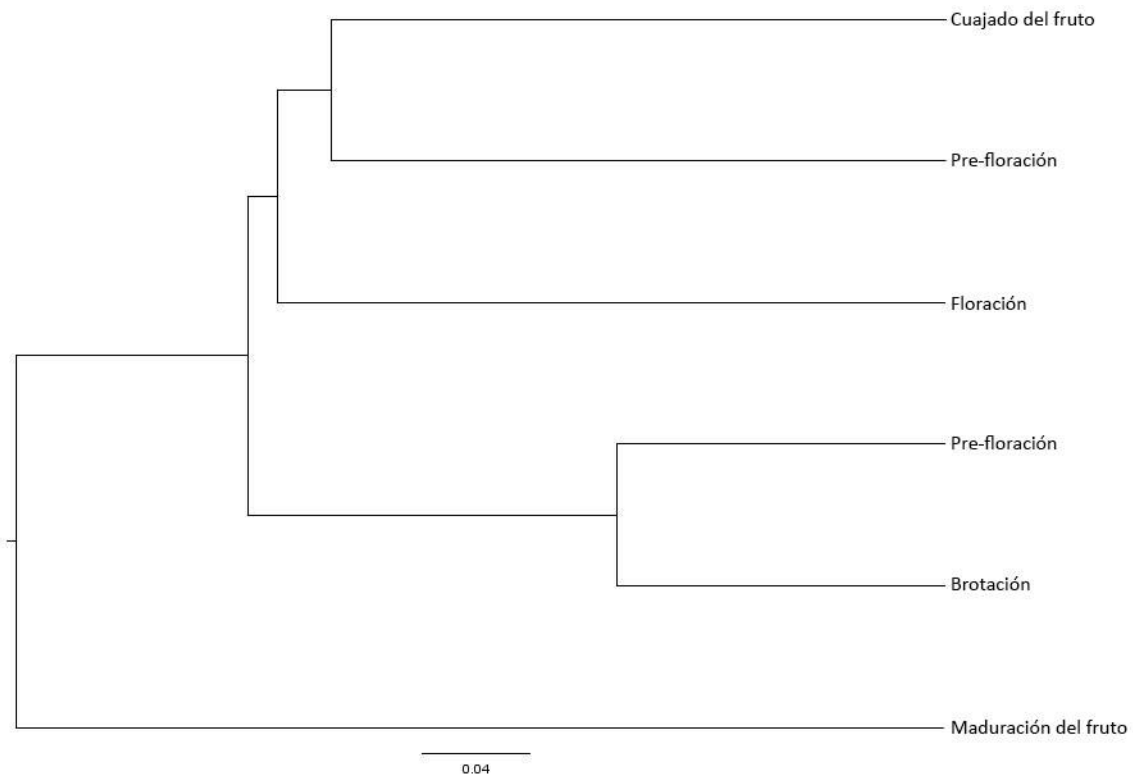


Figura 4.4 Dendrograma correspondiente a las muestras del bacterioma del peral analizadas mediante Illumina MiSeq, basado en la matriz de similitud obtenida utilizando el índice de similitud Bray-Curtis y el método de agrupación jerárquica "unweighted pair-group method" (UPGMA). La barra indica el % de similitud.

Tabla 4.11 Modelos experimentales que se ajustan a la dinámica temporal del bacterioma.

Modelo	Brotación	Prefloración	Floración	Postfloración	Cuajado del fruto	Maduración del fruto
Tres clusters		Inicial			Intermedio	Final
Circular		Inicial-Final			Intermedio	Inicial-Final

Las 2.076.531 secuencias bacterianas están afiliadas a 19 filos, además de las bacterias sin clasificar (Tabla 4.12). Los filos dominantes (>1% de abundancia relativa), ordenados en orden decreciente de abundancia, Deinococcus-Thermus (41,31% de media, 15,38-72,08%), seguido por Proteobacteria (33,95% de media, 18,81-75,35%),

Firmicutes (8,18% de media, 0,07-22,11%), Bacteroidetes (4,65% de media, 1,62-6,93%) y Saccharibacteria (TM7) (3,83% de media, 0,35-8,91%), además de las bacterias no clasificadas (2,17% de media, 0,14-4,75%). De todos ellos, en el diseño de tres clusters, el filo Firmicutes es significativamente ($p < 0,05$) más abundante en el *cluster* correspondiente a los estadios intermedios, mientras que *Deinococcus-Thermus* presenta una abundancia significativamente mayor ($p < 0,05$) en los estadios iniciales. En el diseño circular, se observa que las secuencias del filo Acidobacteria están significativamente más presentes en los estadios intermedios ($p < 0,05$).

Tabla 4.12 Número de secuencias que pertenecen a cada uno de los 19 filos bacterianos de la filosfera del peral obtenidos mediante Illumina MiSeq.

Filo	Total	B [^]	E [^]	F [^]	O [^]	Q [^]	L [^]
Acidobacteria**	3396	90	549	841	657	1083	176
Actinobacteria	19301	2355	3347	5792	1993	3425	2389
Aquificae	5	0	0	5	0	0	0
Armatimonadetes	1467	48	294	318	383	161	263
Bacteroidetes	96567	13724	24408	20047	8587	6063	23738
Chlamydiae	50	1	0	36	12	0	1
Chlorobi	2	0	0	0	2	0	0
Chloroflexi	1134	0	94	994	44	2	0
Deinococcus-Thermus*	940958	240094	208621	158615	100211	180727	52690
Fibrobacteres	2	0	2	0	0	0	0
Fusobacteria	6	0	6	0	0	0	0
Gemmatimonadetes	343	0	74	219	18	31	1
Nitrospira	148	1	12	113	11	10	1
Proteobacteria	704973	65765	102456	113199	95377	70156	258020
Tenericutes	44	0	8	25	1	4	6
Verrucomicrobia	75	0	6	47	7	13	2
Bacterias sin clasificar	45215	475	5442	18531	2404	17431	932
Cyanobacteria	40	0	16	5	6	12	1
Firmicutes*	183131	248	5632	36697	55099	82455	3000
Saccharibacteria	79674	10288	9466	34776	12645	11315	1184

*Filos que presentan diferencias significativas entre las agrupaciones correspondientes al diseño tres clusters.

**Filos que presentan diferencias significativas entre los grupos del diseño circular.

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

En la Tabla 4.13 se muestra que los géneros o niveles taxonómicos más específicos presentes en un porcentaje superior al 1% son 15 y pertenecen a 5 filos: *Deinococcus* (30,57%), *Deinococcaceae* (12,87%) y *Truepera* (1,03%) del filo *Deinococcus-Thermus*; *Sphingomonas* (9,06%), *Methylobacterium* (5,80%), *Enterobacteriaceae* (2,84%),

Sphingomonadaceae (1,82%), Comamonadaceae (1,27%), Oxalobacteraceae (1,20%) y *Serratia* (1,18%) del filo Proteobacteria; un género (3,83%) del filo Saccharibacteria (TM7); *Clostridium* (3,34%), Bacilli (1,71%), *Clostridium XI* (1,45%) del grupo Firmicutes; *Hymenobacter* (2,71%) perteneciente a Bacteroidetes y un 2,17% de secuencias bacterianas no clasificadas. De estos taxones más abundantes, hay tres que se presentan en un porcentaje superior en los estadios iniciales (brotación y prefloración) comparado con los estadios de floración, postfloración y cuajado del fruto, y son el género *Sphingomonas* y las familias Sphingomonadaceae y Comamonadaceae, todos pertenecientes al filo Proteobacteria. Por otro lado, el género *Truepera*, del filo Deinococcus-Thermus, es significativamente ($p < 0,05$) más abundante en las fases intermedias que en la inicial y final del ciclo fenológico.

Tabla 4.13 Porcentaje de secuencias que pertenecen a cada uno de los géneros bacterianos más abundantes (>1%) de la filosfera del peral obtenidos mediante Illumina MiSeq.

Filo	Género ⁺	Total	B [^]	E [^]	F [^]	O [^]	Q [^]	L [^]
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>	30,57	47,13	38,30	30,39	19,76	32,85	12,82
Deinococcus-Thermus	Deinococcaceae sin clasificar	12,87	24,93	18,19	5,61	14,46	13,10	2,26
Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> *	9,06	5,77	6,40	4,64	4,47	4,37	28,92
Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	5,79	3,75	3,57	3,51	3,44	3,40	17,23
Saccharibacteria	Grupo TM7a	3,84	3,09	2,63	8,91	4,56	3,03	0,35
Firmicutes	<i>Clostridium</i> sensu stricto	3,34	0,04	0,76	4,52	10,91	4,48	0,56
Proteobacteria	Enterobacteriaceae sin clasificar	2,84	0,99	1,85	3,56	7,48	0,13	4,08
Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>	2,71	2,72	3,54	2,01	1,28	0,51	6,19
Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar	2,18	0,14	1,51	4,75	0,87	4,67	0,27
Proteobacteria	Sphingomonadaceae sin clasificar	1,82	0,91	1,39	1,50	0,67	0,62	5,77
Firmicutes	Bacilli sin clasificar	1,71	0,00	0,01	0,06	0,22	9,28	0,00
Firmicutes	<i>Clostridium XI</i>	1,45	0,01	0,26	2,03	4,96	1,89	0,14
Proteobacteria	Comamonadaceae sin clasificar*	1,27	1,95	2,74	0,87	0,51	0,71	0,77
Proteobacteria	Oxalobacteraceae sin clasificar*	1,20	1,06	1,29	0,66	0,32	0,46	3,39
Proteobacteria	<i>Serratia</i>	1,19	1,55	2,55	2,13	0,27	0,31	0,02
Deinococcus-Thermus	<i>Truepera</i> **	1,03	0,00	1,03	1,99	1,81	1,28	0,00
Otros	Otros	17,13	5,96	13,99	22,87	24,02	18,90	17,23

*Filos que presentan diferencias significativas entre las agrupaciones correspondientes al diseño tres clusters.

**Filos que presentan diferencias significativas entre los grupos del diseño circular.

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

Mediante la herramienta LEfSe se ha establecido que OTUs son representativos de los diferentes estadios fenológicos, o de su agrupación y que por tanto pueden ser considerados como biomarcadores de los mismos. Para el diseño de 3 clusters, la

herramienta ha establecido únicamente 3 OTUs, los tres pertenecen a las fases iniciales, y tienen la misma afiliación filogenética, género de posición indeterminada (*inc. sed.*) del filo Saccharibacteria. Sin embargo, para el diseño circular, como se muestra en la figura 4.5, son 6 los filos que han resultado ser representativo y podrían considerarse biomarcadores. Los filos son: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Saccharibacteria, además de las bacterias no clasificadas. Como puede observarse, el porcentaje de Bacteroidetes y de Proteobacterias es mayor en los estadios iniciales y final mientras que los filos Firmicutes y Acidobacteria son representativos de las fases intermedias y no están presentes en el cluster inicial-final.

En la tabla 4.14 se muestran los 57 taxones representativos para los dos *clusters* del diseño circular (estadios inicial y final y estadios intermedios), además de las bacterias no clasificadas. Puede observarse que la mayoría de taxones solo aparecen como representativos en una de las dos agrupaciones.

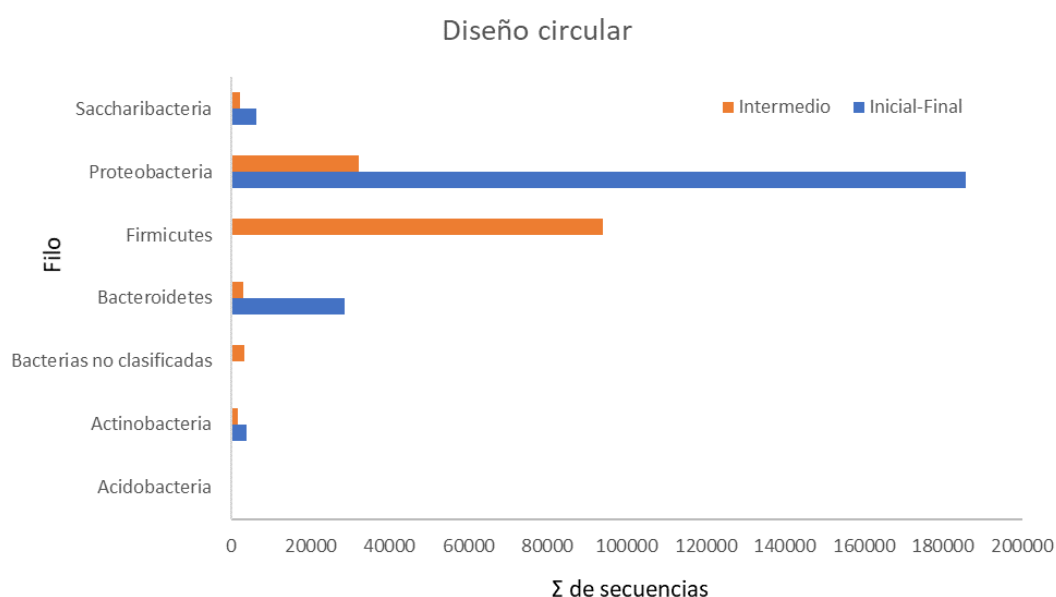


Figura 4.5 Análisis mediante LEfSe de los grupos bacterianos representativos del diseño circular a nivel de filo. El grupo inicial-final incluye los estadios de brotación, prefloración y maduración del fruto, mientras que el grupo intermedio incluye los estadios de floración, postfloración y cuajado del fruto. Datos obtenidos mediante Illumina MiSeq.

Tabla 4.14 Géneros bacterianos representativos de cada uno de los grupos del diseño circular según la herramienta LEfSe.

Filo	Especie	Exterior	Centre
Acidobacteria	<i>Bryobacter</i>	0	218
	<i>Curtobacterium</i>	1791	0
	<i>Kineococcus</i>	354	0
	Microbacteriaceae	1775	0
	<i>Arthrobacter</i>	0	925
	Intrasporangiaceae	0	446
	<i>Ornithinimicrobium</i>	0	315
Bacterias no clasificadas	Bacterias no clasificadas	0	3445
Bacteroidetes	Chitinophagaceae	0	2438
	<i>Chryseobacterium</i>	0	557
	<i>Hymenobacter</i>	27686	0
	<i>Mucilaginibacter</i>	1001	0
Firmicutes	<i>Aerococcus</i>	0	940
	Alicyclobacillaceae	0	2607
	Bacilli	0	557
	<i>Bacillus</i>	0	4410
	<i>Clostridium</i>	0	78931
	<i>Jeotgalicoccus</i>	0	176
	Lachnospiraceae	0	1432
	Lactobacillales	0	1499
	<i>Lactobacillus</i>	0	155
	Planococcaceae	0	532
	Ruminococcaceae	0	195
	<i>Turicibacter</i>	0	2489
Proteobacteria	Comamonadaceae	9608	0
	<i>Massilia</i>	14453	0
	<i>Methylobacterium</i>	41602	307
	Oxalobacteraceae	4882	0
	Proteobacteria	426	0
	<i>Rhizobium</i>	1296	0
	<i>Roseomonas</i>	2695	456
	Sphingomonadaceae	18452	2432
	<i>Sphingomonas</i>	92413	2984
	Acetobacteraceae	0	3912
	<i>Acinetobacter</i>	0	808
	<i>Arenimonas</i>	0	250
	Bradyrhizobiaceae	0	512
	<i>Brevundimonas</i>	0	272
	Burkholderiales	0	401
	<i>Devosia</i>	0	129
	Enterobacteriaceae	0	2211
	Erythrobacteraceae	0	372
	Gammaproteobacteria	0	2318
	Methylocystaceae	0	171
<i>Ochrobactrum</i>	0	187	
<i>Paracoccus</i>	0	763	
<i>Phenylobacterium</i>	0	548	

Tabla 4.14 continuación

Filo	Especie	Exterior	Centre
Proteobacteria	<i>Porphyrobacter</i>	0	190
	<i>Psychrobacter</i>	0	807
	<i>Ralstonia</i>	0	1462
	<i>Rhizobacter</i>	0	676
	Rhizobiales	0	1494
	Rhodobacteraceae	0	209
	<i>Rickettsia</i>	0	5517
	<i>Rubellimicrobium</i>	0	1091
	Sphingomonadales	0	1350
Xanthomonadaceae	0	475	
Saccharibacteria	<i>TM7 genus incertae sedis</i>	6287	2228

+ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

^ El grupo inicial-final incluye los estadios de brotación, prefloración y maduración del fruto, mientras que el grupo intermedio incluye los estadios de floración, postfloración y cuajado del fruto.

El *core* de la filosfera del peral consta de 8 OTUs (tabla 4.15), que en realidad corresponden a 3 géneros: *Deinococcus*, del filo, Deinococcus-Thermus y *Methylobacterium* y *Sphingomonas* del filo Proteobacteria. También podemos observar que el género Hymenobacter, representante del filo Bacteroidetes forma parte del *core* de los estados de brotación, prefloración y maduración del fruto en ambos diseños. Sin embargo, este género no se encuentra en el *core* correspondiente a los estadios intermedios. Lo mismo ocurre con dos taxones de la clase Betaproteobacteria, el género *Massilia* y la familia Comamonadaceae. Al contrario, el filo Firmicutes representado por el género Clostridium forma parte solo de los *cores* de los estados intermedios para los dos diseños. Por último, en el estadio de maduración del fruto, que diferencia los dos diseños, cinco géneros de Proteobacterias (*Telluria*, *Buttiauxella*, *Escherichia*, *Rhizobium* y *Pantoea*) forman parte de su *core*, y no están en las etapas iniciales, mientras que en estas encontramos a otras dos proteobacterias (*Serratia* y *Roseomonas*) que no están presentes en el *core* de maduración del fruto.

Tabla 4.15 OTUs representados en el core global de todas las muestras y para cada uno de los grupos de los dos diseños experimentales, el circular y el de tres clusters.

OTU	Filo	Género	Global	Circular [^]		Tres clusters [^]		
				I - F	Inter	I	Inter	F
Otu00012	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>						
Otu00032	Bacteroidetes	<i>Hymenobacter</i>						
Otu00001	Deinococcus-Thermus	Deinococcaceae						
Otu00002	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>						
Otu00003	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>						
Otu00008	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>						
Otu00010	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>						
Otu00020	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>						
Otu00092	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>						
Otu00005	Firmicutes	<i>Clostridium</i>						
Otu00036	Firmicutes	<i>Clostridium</i>						
Otu00014	Firmicutes	Clostridium XI						
Otu00015	Proteobacteria	<i>Buttiauxella</i>						
Otu00019	Proteobacteria	Comamonadaceae						
Otu00025	Proteobacteria	Comamonadaceae						
Otu00018	Proteobacteria	Enterobacteriaceae						
Otu00029	Proteobacteria	Enterobacteriaceae						
Otu00045	Proteobacteria	<i>Escherichia</i>						
Otu00017	Proteobacteria	<i>Massilia</i>						
Otu00007	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>						
Otu00011	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>						
Otu00022	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>						
Otu00027	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>						
Otu00071	Proteobacteria	Oxalobacteraceae						
Otu00075	Proteobacteria	Oxalobacteraceae						
Otu00026	Proteobacteria	<i>Pantoea</i>						
Otu00033	Proteobacteria	<i>Rhizobium</i>						
Otu00035	Proteobacteria	<i>Roseomonas</i>						
Otu00016	Proteobacteria	<i>Serratia</i>						
Otu00013	Proteobacteria	Sphingomonadaceae						
Otu00004	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>						
Otu00006	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>						
Otu00021	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>						
Otu00038	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>						
Otu00082	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>						
Otu00079	Proteobacteria	<i>Telluria</i>						

[^] I-F: grupo inicial y final (brotación, prefloración y maduración del fruto), Inter: grupo intermedio (floración, postfloración y cuajado del fruto), I: frupo inicial (brotación y prefloración), F: final (maduración del fruto).

Comunidad fúngica

El análisis de las muestras con Illumina MiSeq generó 2.934.646 secuencias, que una vez minimizados los errores de PCR y secuenciación, el número de secuencias se redujo a 1.960.572. En la tabla 4.16a se muestra cómo están repartidas dichas secuencias en los diferentes estadios fenológicos analizados. Al igual que en el caso la comunidad bacteriana, los OTUs se han obtenido teniendo en cuenta que las secuencias que los integran presentan, al menos, un 97% de similitud. Los índices de Shannon son significativamente ($p < 0,05$) superiores a los obtenidos en el análisis mediante DGGE (Tabla 4.1) pero similares a los correspondiente al estudio mediante genotecas (Tabla 4.6). El valor más bajo para este índice es de 1,53 y corresponde al estado de prefloración; mientras que el más elevado es de 2,972 y pertenece a la fase de cuajado del fruto. Las curvas de rarefacción, nos muestran que en la mayoría de los estadios analizados se aproximan a la saturación, tanto teniendo en cuenta todas las secuencias procesadas como solo las del subgrupo que utilizaremos para la β -diversidad (258.644 secuencias) (Figura S4.7). La muestra correspondiente al micobioma del estadio de maduración del fruto es la que más se aleja de la asíntota, aun así, la cobertura de este estadio es de 0,999 (Tabla 4.16).

Tabla 4.16 Número de secuencias, y α -diversidad para cada una de las muestras del micobioma. a) Secuencias totales b) Secuencias utilizadas para hacer los estudios de β -diversidad.

a)

Muestra	Lecturas iniciales	Lecturas procesadas	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
Brotación	456.701	314.472	439	0,999	1,628	953,20
Prefloración	449.463	319.472	320	0,999	1,530	1.004,91
Floración	483.009	349.899	720	0,999	1,971	2.874,77
Postfloración	454.459	300.296	1427	0,997	1,894	5.651,58
Cuajado del fruto	620.832	417.789	1125	0,999	2,972	3.892,90
Maduración del fruto	470.182	258.644	654	0,999	2,473	1.384,38

Tabla 4.16 continuación

b)

Muestra	Lecturas procesadas	Lecturas subgrupo	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
Brotación	314.472	258.644	399	0,999	1,627	942,24
Prefloración	319.472	258.644	281	0,999	1,529	747,57
Floración	349.899	258.644	586	0,998	1,971	2.292,38
Postfloración	300.296	258.644	1289	0,997	1,895	4.676,42
Cuajado del fruto	417.789	258.644	873	0,998	2,973	3.029,34
Maduración del fruto	258.644	258.644	654	0,999	2,473	1.384,38

El dendrograma obtenido a partir del análisis de agrupación de las muestras (Figura 4.6) muestra que los estados iniciales: prefloración, floración y brotación forman un grupo compacto. Puede observarse en la figura que a medida que se avanza en las distintas fases del ciclo fenológico su disimilitud es mayor, hasta llegar a la maduración del fruto que es el que difiere más del resto, como ya se puso de manifiesto en el bacterioma (Figura 4.4). Los índices de diversidad (Tabla 4.14) de los tres primeros estadios son inferiores al resto, aunque no lo suficiente para ser significativamente ($p < 0,05$) distintos.

Cuando comparamos la agrupación que incluye los tres estadios iniciales (brotación, prefloración y floración) respecto al resto (postfloración, cuajado del fruto y maduración del fruto), tanto los análisis referentes a los índices de diversidad mediante t de student, como las Amova y Homova muestran que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$), pero los valores de estas pruebas oscilan entre 0,055 y 0,07. Teniendo en cuenta estos resultados junto con la agrupación observada en el dendrograma (figura 4.6), en las comparaciones entre estadios, que se realizarán en los próximos análisis, los tres estadios iniciales deben considerarse como un grupo diferenciado del resto.

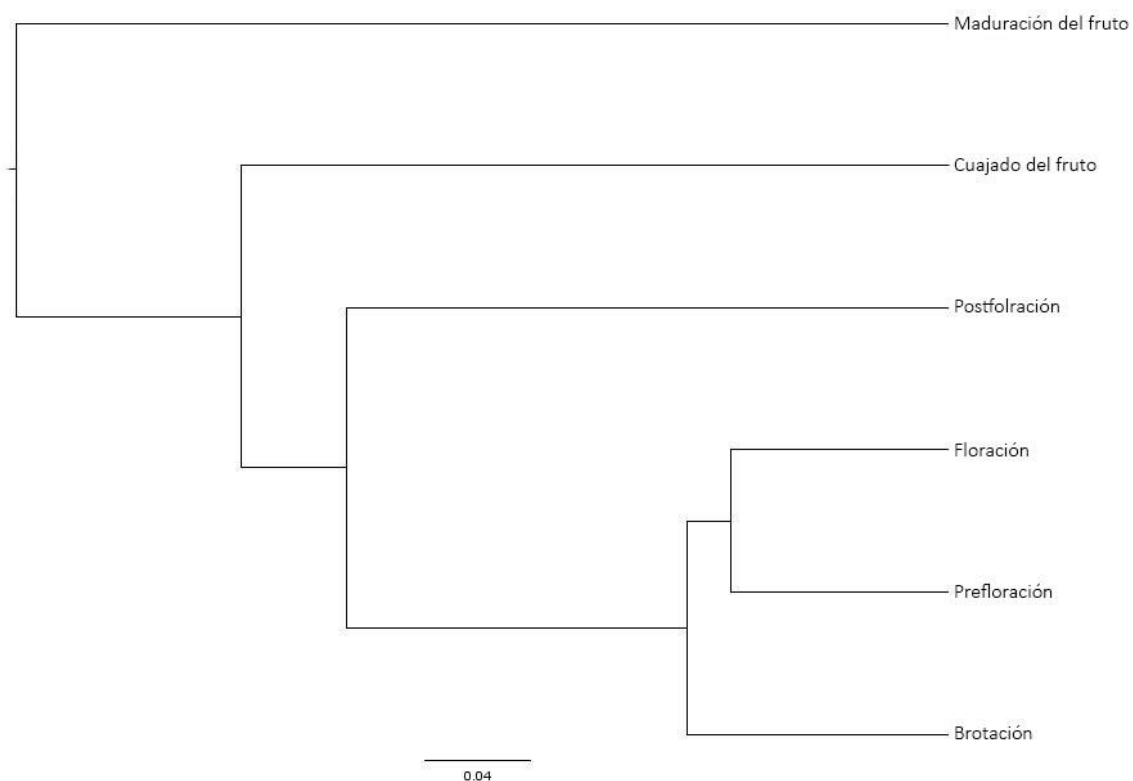


Figura 4.6 Dendrograma obtenido a partir del análisis de cluster de las muestras de Illumina MiSeq del Microbioma del peral, utilizando el índice de similitud Bray-Curtis y el método de agrupación jerárquica "unweighted pair-group method" (UPGMA). La barra indica el % de similitud.

Las 1.960.572 secuencias fúngicas obtenidas se corresponden con 4 filos fúngicos, y 10.476 (0,53% del total de secuencias fúngicas) pertenecen a hongos sin clasificar (tabla 4.17). Los porcentajes de cada filo son: Basidiomycota (58,93%), Ascomycota (40,51%), Mortierellomycota (0,01%) y solo una secuencia del filo Chytridiomycota. Al comparar la abundancia relativa de los filos, observamos que el filo Ascomycota es significativamente más abundante ($p < 0,05$) en los 3 estadios finales y el Basidiomycota en los tres iniciales.

En la tabla 4.18 se detallan los taxones dominantes ($>1\%$) en las muestras fúngicas de la filosfera del peral, y concretamente son 9 taxones: *Vishniacozyma tephrensis*, *Cladosporium sp*, *Vishniacozyma sp*, *Vishniacozyma carnescens*, *Alternaria sp*, *Vishniacozyma heimaeyensis*, *Sporidiobolaceae sp*, *Vishniacozyma sp* y *Aureobasidium proteae*. Al comparar la abundancia de estos taxones a nivel de especie (tabla 4.18) no se observan diferencias significativas entre los 3 primeros estadios y el resto. No

obstante, si agrupamos todos los OTUs correspondientes al género *Vishniacozyma*, la abundancia es significativamente ($p < 0,05$) más alta en las muestras de los tres estadios iniciales que en el resto.

Tabla 4.17 Número de secuencias que pertenecen a cada uno de los 5 filos fúngicos presentes en la filosfera del peral en las diferentes fases del ciclo vegetativo. Datos obtenidos a partir de Illumina MiSeq

Filo	Total	B [^]	E [^]	F [^]	O [^]	Q [^]	L [^]
Ascomycota*	794406	44306	89575	72030	215598	119175	253722
Basidiomycota*	1155478	269805	229162	273947	198218	139079	45267
Chytridiomycota	1	0	0	1	0	0	0
Hongos sin clasificar	10476	348	730	3918	3794	380	1306
Mortierellomycota	211	13	5	3	179	10	1

*Filo que presenta diferencias significativas entre el grupo brotación, prefloración y floración y el resto de estadios fenológicos.

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

Tabla 4.18 Porcentaje de secuencias pertenecientes a cada uno de las especies fúngicas más abundantes (>1%) presentes en las muestras de filosfera del peral. Datos obtenidos a partir de Illumina MiSeq

Filo	Especie ⁺	Total	B [^]	E [^]	F [^]	O [^]	Q [^]	L [^]
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>	34,484	49,661	53,722	51,755	32,326	10,698	1,487
Ascomycota	<i>Cladosporium spp</i>	29,063	11,110	25,383	15,350	26,950	37,180	63,702
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma spp</i>	9,964	15,822	9,113	11,484	1,985	22,526	3,248
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	4,204	14,380	5,820	4,456	0,000	0,035	0,977
Ascomycota	<i>Alternaria spp</i>	3,623	0,081	0,004	0,077	6,067	4,194	11,421
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	1,804	2,361	1,055	0,716	4,820	0,475	0,234
Basidiomycota	<i>Sporidiobolaceae spp</i>	1,202	0,008	0,020	0,232	1,382	6,460	0,058
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma spp</i>	1,083	2,895	1,470	0,953	0,225	1,077	0,124
Ascomycota	<i>Aureobasidium proteae</i>	1,052	1,813	0,975	0,285	1,727	0,865	0,452

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico.

[^]Los diferentes estados fenológicos de peral y manzano B: Brotación, E: Prefloración, F: Floración, O: Postfloración, Q: Cuajado del fruto, L: Maduración del fruto.

El resultado de la prueba LEfSe para estas muestras (Figura 4.7) establece que el filo representativo para los estadios iniciales es el de Basidiomycota, en cambio, en los 3 estadios restantes el filo representativo es el de Ascomycota, aunque en estos estadios también son representativos algunos taxones del filo Basidiomycota. Estos datos coinciden con las diferencias significativas mostradas en la tabla 4.17.

De las muestras iniciales, todos los taxones del filo Basidiomycota representativos pertenecen al género *Vishniacozyma* (tabla 4.19). Sin embargo, en los tres estadios finales del desarrollo fenológico, encontramos hasta 18 géneros, además de algunas familias correspondientes a ambos filos. El género con más representatividad es *Alternaria*, seguido, curiosamente de un género del filo Basidiomycota, *Filobasidium* (tabla 4.19).

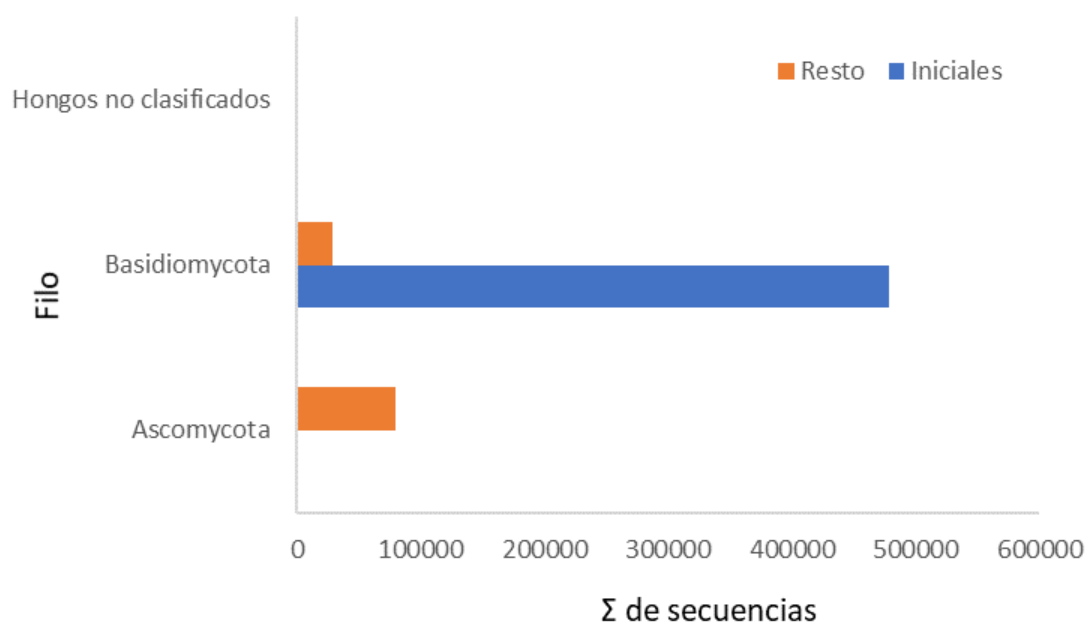


Figura 4.7 Análisis mediante LEfSe de los grupos fúngicos representativos a nivel de filo. El grupo de estadios iniciales incluye los estadios de brotación, prefloración y floración, mientras que el grupo resto incluye los estadios de postfloración, cuajado y maduración del fruto. Datos obtenidos mediante Illumina MiSeq.

Utilizando la herramienta Microbiome para R, se ha analizado el *core* fúngico global de la filosfera del peral, así como el grupo correspondiente al grupo que incluye los tres estadios iniciales y el perteneciente al resto, es decir a las tres fases finales del ciclo fenológico, por separado. En la tabla 4.20 se puede observar que el *core* de todas las muestras lo constituyen 4 OTUs, que están filogenéticamente asociados a dos géneros, *Cladosporium* (Ascomycota) y *Vishniacozyma* (Basidiomycota). *Vishniacozyma tephrensensis* es una especie que forma parte del core en todos los casos, pero hay otras dos especies de este género, *Vishniacozyma carnescens* y *Vishniacozyma*

heimaeyensis, que solamente pertenecen al core de los primeros estadios fenológicos. Los géneros *Alternaria* y *Hysteriaceae* (Ascomycota) junto con *Filobasidium globisporum* (Basidiomycota) completan el core de los estadios finales.

Tabla 4.19 Taxones representativos, a nivel de género o especie en el grupo inicial que incluye los estadios de Brotación, prefloración y floración de la filosfera del peral en comparación con el resto (postfloración, cuajado y maduración del fruto) según la herramienta LEfSe.

Filo	Especie*	Iniciales	Resto
Ascomycota	<i>Alternaria spp</i>	0	56587
	<i>Blumeria spp</i>	0	137
	<i>Cladosporium aggregatocicatricatum</i>	0	3451
	<i>Cladosporium spp</i>	0	142
	Dothideomycetes	0	4507
	<i>Fusarium spp</i>	0	320
	Helotiales	0	233
	Hysteriaceae	0	6179
	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	0	279
	<i>Neocatenulostroma microsporum</i>	0	237
	<i>Phaeosphaeria spp</i>	0	207
	Pleosporales	0	250
	<i>Protomyces spp</i>	0	278
	<i>Pyrenophora graminea</i>	0	610
	<i>Ramularia collo-cygni</i>	0	172
	<i>Stemphylium spp</i>	0	934
	<i>Taphrina spp</i>	0	230
<i>Tumularia spp</i>	0	4576	
<i>Zymoseptoria spp</i>	0	349	
Basidiomycota	<i>Bullera alba</i>	0	977
	<i>Filobasidium spp</i>	0	2593
	<i>Filobasidium globisporum</i>	0	9805
	<i>Filobasidium oeirense</i>	0	8902
	<i>Rhodotorula spp</i>	0	4281
	<i>Sporobolomyces spp</i>	0	1359
	<i>Vishniacozyma spp</i>	5380	0
	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	67477	0
	<i>Vishniacozyma globispora</i>	0	377
	<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	404972	0
Hongos no clasificados	Hongos no clasificados	0	455

* en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

Tabla 4.20 OTUs representados en el *core* del microbioma global, obtenido a partir de las muestras correspondientes a los diferentes estados fenológicos de la filosfera del peral; así como el *core* correspondiente al grupo que incluye los estadios iniciales (brotación, prefloración y floración) y el que incluye al Resto (postfloración, cuajado y maduración del fruto).

OTU	Filo	Especie	Global	Iniciales	Finales
Otu0006	Ascomycota	<i>Alternaria sp</i>			
Otu0002		<i>Cladosporium sp</i>			
Otu0004		<i>Cladosporium sp</i>			
Otu0014		<i>Hysteriaceae</i>			
Otu0013	Basidiomycota	<i>Filobasidium globisporum</i>			
Otu0005		<i>Vishniacozyma carnescens</i>			
Otu0007		<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>			
Otu0003		<i>Vishniacozyma sp</i>			
Otu0012		<i>Vishniacozyma sp</i>			
Otu0001		<i>Vishniacozyma tephrensii</i>			

4.2 Discusión

Para el estudio de la microbiota asociada a la filosfera de dos árboles frutales de la familia Rosaceae se han utilizado tres aproximaciones moleculares diferentes. De esta manera, además de estudiar la diversidad bacteriana y fúngica presente en el microbioma de la filosfera, se han comparado los resultados obtenidos con cada técnica. También se han establecido unos posibles patrones de sucesión microbiana, así como los biomarcadores característicos de cada etapa y el *core* del microbioma presente a lo largo de todo el ciclo fenológico.

4.2.1 Análisis comparativo de tres metodologías moleculares utilizadas para el estudio de la diversidad microbiana de la filosfera

En este capítulo se han utilizado tres metodologías para el estudio de la diversidad microbiana de la filosfera de dos especies vegetales: *Malus domestica* var *Golden delicious* y *Pyrus communis* var *Passe crassane*. Los resultados obtenidos nos han permitido determinar la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas que integran su filosfera. Seguidamente se analizarán y discutirán algunos de los resultados

obtenidos mediante las tres metodologías. Todas ellas nos permiten disponer de índices de diversidad, en la tabla detallándose 4.21 los valores obtenidos para cada una de ellas. Respecto del bacterioma, solo hay dos situaciones en las que no se encuentran diferencias significativas entre los índices de diversidad, cuando se comparan los índices de Shannon correspondientes a las genotecas con los obtenidos a partir de la secuenciación masiva mediante Illumina y al comparar los índices de Equidad obtenidos a partir de los perfiles de DGGE y los pertenecientes a las genotecas. Los valores de riqueza de especies más elevados corresponden a los obtenidos mediante secuenciación masiva, al igual que los correspondientes a las genotecas siempre son superiores a los de DGGE. Solo hay una excepción en que el índice de Equidad, es superior en DGGE y en genotecas que en Illumina (Tabla 4.21). En cuanto a los índices de diversidad del micobioma el único cambio con respecto al bacterioma es que tampoco hay diferencias significativas entre DGGE e Illumina respecto del índice de Shannon. La baja riqueza obtenida a partir del análisis mediante DGGE es debida, tal y como mencionaban los autores en la propia descripción de la DGGE, a que no es posible identificar aquellos miembros de la comunidad que estén presentes en una abundancia inferior al 1%¹⁵⁰. Así pues, se puede concluir que cada herramienta que hemos utilizado nos más resolución que la anterior, pero esa reducción en la Equidad nos sugiere que Illumina magnifica las diferencias entre los OTUs, y que los que son más abundantes en la muestra original, están sobrerrepresentados cuando utilizamos esta técnica.

En la tabla 4.22 están listados los géneros presentes en una abundancia superior al 10% para cada una de las metodologías utilizadas. La mayoría de los géneros coinciden, en las diferentes técnicas, lo que nos indica que las tres metodologías utilizadas constituyen una buena aproximación para caracterizar los taxones dominantes de una comunidad; no obstante, como era de esperar la secuenciación masiva mediante Illumina permite profundizar más en el conocimiento de la diversidad de aquellas poblaciones menos abundantes, a la vez que proporciona una potencia estadística superior. De los géneros bacterianos más abundantes en las muestras de la filosfera de ambos árboles, Yashiro y colaboradores¹³⁸ se referían a

Methylobacterium, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* como tres de los géneros más abundantes en la filosfera de manzano. Esto coincide con los géneros más abundantes observados en este estudio cuando se utilizó la aproximación mediante genotecas, la misma que se utilizaron Yashiro y colaboradores.

Gracias a la utilización de estas tres metodologías se ha podido poner de manifiesto que la DGGE es una técnica que permite el procesamiento ágil de una gran cantidad de muestras, y una buena aproximación para valorar la afiliación filogenética de los grupos taxonómicos abundantes y valorar los cambios que experimentan a lo largo del tiempo o en respuesta a cualquier tipo de perturbación. Las técnicas de secuenciación masiva, en este caso Illumina, nos confiere una profundidad taxonómica mucho mayor, y nos permiten detectar microorganismos que nunca antes se habían encontrado en la filosfera de árboles frutales, así como microorganismos que hasta el momento no se han podido aislar (2,17% de secuencias no clasificadas, que pertenecen a 2028 OTUs, tabla 4.12)¹⁶⁹, además aporta robustez estadística a los análisis¹⁷⁰, pero por su coste algo más elevado y la dificultad de poder manejar una cantidad ingente de secuencias la hace una técnica no recomendable para experimentos con muchas réplicas. Una combinación de ambas técnicas podría ser una buena aproximación a diseños experimentales que comportan el análisis de un elevado número de muestras, de manera que la DGGE se aplicaría inicialmente para medir las diferencias existentes entre ellas, a nivel de composición taxonómica, y como técnica de cribado para determinar que muestras son más relevantes para luego proceder a una secuenciación masiva de las mismas. En último lugar, las genotecas resultan un paso intermedio, que ni es tan barato y rápido como la DGGE, ni tan profundo como la secuenciación masiva.

Tabla 4.21 Comparación de los índices de diversidad obtenidos para cada una de las tres técnicas moleculares utilizadas para el estudio de la filosfera del manzano y peral.

a) comunidad bacteriana b) comunidad fúngica

a)		Shannon			Riqueza			Equidad			Chao	
		DGGE	Genoteca	Illumina	DGGE	Genoteca	Illumina	DGGE	Genoteca	Illumina	Genoteca	Illumina
Manzano	Brotación	1,53	3,20		7,33	40		0,762	0,863		69	
	Prefloración	1,56	3,40		10,50	55		0,665	0,861		80	
	Floración	1,50	2,50		7,67	42		0,747	0,673		65	
	Postfloración	1,37	2,70		7,17	46		0,697	0,716		80	
	Cuajado del fruto	1,38	1,10		8,17	7		0,683	0,570		7	
	Maduración del fruto	1,00	2,30		3,67	19		0,771	0,781		30	
Peral	Brotación	1,78	3,20	2,75	9,33	42	2.884	0,800	0,854	0,345	61	10.878
	Prefloración	1,77	4,00	3,77	8,83	85	5.216	0,813	0,902	0,440	174	13.788
	Floración	1,58	4,20	4,89	9,67	88	5.282	0,699	0,927	0,570	249	16.305
	Postfloración	1,66	3,40	4,50	9,00	66	6.526	0,756	0,823	0,452	181	15.724
	Cuajado del fruto	1,33	1,50	4,02	7,50	17	4.388	0,651	0,524	0,512	31	13.813
	Maduración del fruto	1,77	1,90	3,66	9,00	24	3.333	0,805	0,590	0,480	77	10.719

b)		Shannon			Riqueza			Equidad			Chao	
		DGGE	Genoteca	Ilumina	DGGE	Genoteca	Ilumina	DGGE	Genoteca	Ilumina	Genoteca	Ilumina
Manzano	Brotación	1,61	3,75		8,33	65		0,767	0,898		324	
	Prefloración	1,57	3,06		9,50	42		0,696	0,820		80	
	Floración	1,95	2,93		14,67	39		0,735	0,800		60	
	Postfloración	1,99	2,42		15,83	40		0,720	0,657		103	
	Cuajado del fruto	1,84	2,32		15,67	43		0,671	0,684		70	
	Maduración del fruto	1,97	2,84		14,50	39		0,739	0,776		54	
Peral	Brotación	1,53	2,43	1,63	11,17	32	439	0,633	0,701	0,272	66	953
	Prefloración	1,32	2,67	1,53	10,17	28	320	0,570	0,803	0,271	42	1.005
	Floración	1,54	2,56	1,97	9,83	44	720	0,686	0,678	0,309	89	2.875
	Postfloración	1,40	2,94	1,89	7,83	51	1.427	0,691	0,747	0,265	162	5.652
	Cuajado del fruto	1,53	2,26	2,97	8,17	30	1.125	0,738	0,720	0,439	48	3.893
	Maduración del fruto	1,81	2,14	2,47	12,50	32	654	0,718	0,619	0,381	49	1.384

Tabla 4.22 Géneros presentes con más de un 10% de abundancia relativa para cada una de las tres técnicas moleculares utilizadas para el estudio de la filosfera del manzano y peral.

Población	DGGE	Genotecas	Ilumina
Bacterias		<i>Pseudomonas</i>	<i>Deinococcus</i>
		<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>
		<i>Methylobacterium</i>	
		<i>Sphingomonas</i>	
		<i>Pantoea</i>	
Hongos		<i>Hymenobacter</i>	
		<i>Cladosporium</i>	<i>Vishniacozyma</i>
		<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>

4.2.2 El *core* de la filosfera de árboles frutales de pepita

En 2012, Vorholt realizó una revisión sobre el microbioma de la filosfera⁶¹, donde centraba la atención en la diversidad bacteriana, ya que la mayoría de estudios realizados hasta el momento estaban focalizados en este grupo de microorganismos. En dicha revisión se compara la filosfera de varias especies vegetales y se concluye que las Alphaproteobacteria constituyen la mayor parte de las poblaciones bacterianas de la filosfera (un 70%), seguidos por Gammaproteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes. Si comparamos dichos resultados con los obtenidos en este estudio, donde se ha caracterizado la comunidad bacteriana y fúngica de dos especies de árboles frutales, *Malus domestica* y *Pyrus communis*, podemos observar que las bacterias mayoritarias detectadas mediante el análisis de DGGE y genotecas (tablas 4.22 y 4.23) coinciden con los datos reportados en dicho artículo, pero no sucede lo mismo cuando se utiliza una tecnología de secuenciación masiva (Illumina Miseq) ya que en este caso el género más abundante detectado es *Deinococcus* que forma parte del core del bacterioma del peral. El filo Deinococcus-Thermus se había hallado en porcentajes inferiores al 10% en la mayor parte de la filosfera de árboles del estudio realizado por Redford¹⁷¹, y también en estudios realizados concretamente en las flores de manzano¹⁷².

Hoy en día hay consenso sobre que *Methylobacterium* y *Sphingomonas* son abundantes en la filosfera de una amplia variedad de plantas¹⁷³⁻¹⁷⁶, además son beneficiosos para estas, ya sea produciendo fitohormonas o fijando elementos solubles útiles¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Estos estudios acostumbran a ser fotos fijas en un momento concreto del desarrollo del vegetal. En algunos de estos estudios se detecta *Deinococcus*, pero siempre en unos porcentajes del 3-5%. Los resultados obtenidos en este estudio permiten afirmar que *Methylobacterium* y *Sphingomonas* son parte importante de la microbiota peral y manzano y que están presentes durante todo el ciclo fenológico del árbol. Sin embargo, también se ha identificado el género *Deinococcus* (filo Deinococcus-Thermus), presente a lo largo de todo el ciclo, y siempre en porcentajes por encima del 13%, llegando a representar el 47% en el estadio de

brotación (Tabla 4.13). Diferentes especies de *Deinococcus* poseen una gran resistencia a la radiación UV¹⁸⁰, y esta podría ser una de las causas de esos elevados porcentajes. Así pues la diferencia más notable con el trabajo de Vorholt sería la consideración del género *Deinococcus* como microorganismo mayoritario en la filosfera de vegetales, una posible explicación a esta diferencia puede deberse a la técnica empleada o al sesgo de la PCR¹⁸¹.

Los resultados obtenidos respecto del micobioma muestran que los hongos más abundantes coinciden con los que forman parte del *core* en genotecas e Illumina: *Cladosporium* y *Vishniacozyma*, uno de cada filo dominante (tabla 4.23 b). Diferentes artículos hacen referencia a una alta presencia de *Cladosporium*, *Alternaria* y *Vishniacozyma* en el micobioma de la filosfera de diversas plantas^{175,182,183}. *Vishniacozyma* ha mostrado una correlación negativa con *Alternaria*¹⁸², género conocido por contener especies parásitas de plantas¹⁸⁴, además es un posible productor de antibióticos¹⁸⁵. En el *core* obtenido a partir del análisis mediante genotecas se detecta a *Aureobasidium proteae*, este reside en el mismo clado que *Aureobasidium pullulans* y son considerados sinónimos¹⁸⁶. Es un hongo que se ha encontrado en la filosfera de plantas^{187,188}, se trata de uno de los más prometedores agentes de biocontrol utilizados en la protección de plantas, particularmente contra enfermedades postcosecha^{187,189–192}.

Los resultados obtenidos para el *core* de los dos árboles frutales coinciden con los microorganismos que ya se habían descrito previamente en la bibliografía^{61,138}. Pero, además, en base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede afirmar que estos taones se mantienen a lo largo de todo el ciclo fenológico del árbol. Con la variable, aportada en este estudio, de un nuevo género integrante del *core* del microbioma de *Pyrus communis*, *Deinococcus*. Cuya abundancia relativa a lo largo del ciclo vegetativo del peral oscila entre el 12,82-47,13%.

Tabla 4.23 Géneros/especies que constituyen el *core* del bacterioma (a) y el micobioma (b) de la filosfera peral y manzano

a)

Filo	Género	Genoteca		Illumina	
		Total	Manzano	Peral	Peral
Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	■		■	■
	<i>Sphingomonas</i>				■
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus</i>				■

b)

Filo	Especie ⁺	Genoteca		Illumina	
		Total	Manzano	Peral	Peral
Ascomycota	<i>Alternaria spp</i>	■	■	■	
	<i>Aureobasidium proteae</i>	■		■	
	<i>Cladosporium spp</i>	■		■	■
	Dothideomycetes	■		■	■
Basidiomycota	<i>Vishniacozyma spp</i>	■			■
	<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>			■	

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico

4.2.3 Cambios en la estructura de la comunidad microbiana de la filosfera de árboles frutales de pepita a lo largo de su ciclo fenológico

Hemos observado diferencias significativas a nivel de comunidad microbiana entre los diferentes estadios del ciclo fenológico de los árboles objeto de estudio (Figura 4.2), o entre agrupaciones de dichos estadios (Figura 4.6). Las agrupaciones que se establecen difieren un poco en función de si analizamos el micobioma o el bacterioma, pero hay una serie de pautas compartidas. Así pues, brotación y prefloración acostumbran a agruparse y ser significativamente ($p < 0,05$) diferentes de postfloración y cuajado del fruto, siendo la fase de floración como una etapa de transición entre las etapas iniciales y las finales del ciclo. En *Populus deltoides* se han descrito sucesiones bacterianas de una forma cíclica que recuerda al modelo circular propuesto en este trabajo⁸³, si bien, en dicha investigación se estudiaba únicamente el bacterioma y el muestreo era mensual, no ligado a las diferentes fases del desarrollo fenológico del árbol. Por otro lado, cabe resaltar que el estadio fenológico de maduración del fruto es el que presenta un microbioma más distinto al resto de estadios.

Dinámica de las poblaciones bacterianas

En el bacterioma de peral y manzano los distintos estadios del ciclo fenológico suelen agruparse en 2 o tres clusters. Por una parte, podemos encontrar las etapas intermedias floración, postfloración y cuajado del fruto formando un grupo y las fases iniciales de brotación y prefloración agrupadas o no con la etapa final de maduración del fruto.

Los géneros más abundantes de las etapas intermedias, detectados a partir del análisis mediante DGGE (comunicación personal de Jordi Escolano) y genotecas (tabla 4.5 y 4.6) son *Pseudomonas* y *Enterobacter*, sin embargo, mediante Illumina la aparición del filo Deinococcus-Thermus con sus dos géneros, *Deinococcus* y *Truepera*, hace que los anteriores estén en menor porcentaje del esperado teniendo en cuenta los resultados de las técnicas anteriores. Aunque miembros de la familia Enterobacteriaceae aparecen como taxones destacados en etapas intermedias, según LEfSe, no están entre los biomarcadores de éstas. También en estas fases tienen gran relevancia los Firmicutes siendo el género más representado *Clostridium*.

Los géneros bacterianos más característicos del grupo constituido por las etapas de brotación, prefloración y maduración del fruto son *Sphingomonas*, *Hymenobacter*, *Methylobacterium* y *Massilia* (tablas 4.5, 4.6, 4.13, 4.14 y 4.15). *Methylobacterium* y *Sphingomonas* son dos géneros con funciones beneficiosas para las plantas (apartado 1.2.2). *Massilia* es un género capaz de solubilizar metabolitos necesarios para el crecimiento de las plantas como el fosfato¹⁹³.

El estadio de maduración del fruto, si bien comparte la mayoría de los taxones con las etapas de brotación y prefloración, presenta cuatro géneros característicos; *Telluria*, *Buttiauxella*, *Escherichia* y *Pantoea* (tabla 4.15). *Buttiauxella* está relacionada con la supresión de *Rhizoctonia solani*¹⁹⁴. *Pantoea* es un agente de control contra *Erwinia amylovora*¹⁹⁵. *Erwinia amylovora* es una Enterobacteria fitopatógena, conocida como agente causal del fuego bacteriano²⁸, una enfermedad que afecta a la familia Rosaceae (entre otras peral, manzano, níspero y membrillo) y que está extendida mundialmente¹⁹⁶. En Estados Unidos las pérdidas causadas por esta enfermedad se

cifran en 100 millones de \$ anuales¹⁹⁷. El tratamiento que se utilizaba habitualmente, es la aplicación de antibióticos antes de que la infección causara enfermedad¹⁹⁸, propiciando la selección positiva de cepas resistentes¹⁹⁹ a dichos antibióticos, por ello está prohibido en la mayoría de los países. Las medidas fitosanitarias actuales, según el gobierno de España es la tala y destrucción inmediata de las plantas afectadas²⁰⁰. Como podemos observar en la tabla 4.24 la abundancia de *Erwinia* y *Pantoea* en los tres primeros estadios fenológicos es casi nula; en postfloración aparece *Erwinia* y a partir de aquí *Pantoea* es seleccionada positivamente y empieza a disminuir gradualmente *Erwinia*. Esta sucesión natural podría ser modelizada, y adelantarnos a la aparición del patógeno inoculando *Pantoea* manera preventiva.

Tabla 4.24 Porcentajes de abundancia relativa de los géneros *Erwinia* y *Pantoea* expresada en porcentaje a lo largo del ciclo fenológico del Peral, técnica utilizada: Illumina MiSeq.

Género	Brotación	Prefloración	Floración	Postfloración	Cuajado del fruto	Maduración del fruto
<i>Erwinia</i>	0,0084	0,0025	0,0000	2,1099	1,4457	0,7430
<i>Pantoea</i>	0,0015	0,0083	0,0015	0,0299	0,1443	2,0496

Dinámica de las poblaciones fúngicas

Los dendrogramas correspondientes a los resultados obtenidos mediante genotecas (Figura 4.3) y, a partir de los datos de secuenciación masiva (Figura 4.6), siguen una agrupación similar, consistente en dos grupos, uno inicial con los estadios de brotación, prefloración y floración, separado del resto de fases, y que incluye las etapas de postfloración, cuajado y maduración del fruto. La diferenciación entre estos dos grupos es debida al cambio de filo representativo, que, en las fases iniciales, es el filo Basidiomycota, mientras que en el resto es el filo Ascomycota (Tabla 4.17 y figura 4.7).

Entre los géneros pertenecientes al filo Basidiomycota que pueden considerarse biomarcadores del grupo inicial, el más representativo es *Vishniacozyma*, al cual pertenecen el 100% de las secuencias representativas, según LEfSe (Tabla 4.17). En cambio, en el grupo de postfloración, cuajado y maduración del fruto, el protagonismo está más compartido (Tabla 4.17). *Alternaria* es el biomarcador más abundante según

LEfSe (Tabla 4.19), además forma parte del *core* de este grupo. Otro género que cumple las dos condiciones es *Filobasidium*, perteneciente al filo Basidiomycota.

**Capítulo 5. Caracterización de la microbiota bacteriana y
fúngica de distintos suelos supresivos y conductivos
frente a *Meloidogyne spp***

En este capítulo se ha caracterizado la diversidad microbiana de diferentes suelos agrícolas supresivos para el nematodo *Meloidogyne spp*, un endoparásito de las raíces de numerosas especies vegetales inductor de la formación de agallas, en comparación con suelos conductivos para esta enfermedad.

Esta investigación se ha realizado en colaboración con el grupo de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología, de la UPC (campus de Castelldefels) dirigido por el Dr. Sorribas. El equipo de la UPC ha llevado a cabo la valoración de de todos los parámetros relacionados con la infectividad de *Meloidogyne spp* (contaje de huevos, agallas, parasitismo...); mientras que el análisis de la diversidad microbiana de los diferentes suelos supresivos y conductivos para la enfermedad ha sido llevada a cabo en el seno de nuestro grupo de investigación. Este trabajo se enmarca dentro de una colaboración previa, donde se realizó una prospección preliminar sobre la respuesta de distintos suelos de Catalunya frente a *Meloidogyne*²⁰¹. En el actual estudio se han ampliado los análisis para corroborar el status de cada suelo frente a *Meloidogyne spp* y establecer la importancia de la microbiota del suelo en la supresividad en presencia de un cultivo susceptible al patógeno. El objetivo final del presente estudio es la búsqueda de una alternativa a los medios utilizados habitualmente para el control de nematodos patógenos como son las fumigaciones y el uso de pesticidas²³. La Directiva Europea 2009/128/EC recomienda reducir ambos tratamientos, proponiendo el uso de alternativas biológicas como son el uso de antagonistas o potenciadores de crecimiento: en definitiva, el uso de microorganismos beneficiosos para las plantas.

En este apartado se describen los resultados obtenidos en relación a la caracterización de la microbiota bacteriana y fúngica de suelos supresivos y conductivos para nematodos noduladores de raíces, del inglés Root-Knot Nematodes (RKN), concretamente *Meloidogyne spp*. El objetivo es comparar la microbiota característica de ambas tipologías de suelos, así como establecer el microbioma core de cada uno de ellos. Estos datos nos permitirán establecer que microorganismos son característicos de suelos supresivos, que no aparezcan en suelos conductivos, y que por lo tanto puedan ser considerados biomarcadores de los primeros. Estos resultados serán de gran interés para poder potenciar la presencia de dichos microorganismos como

alternativa a las estrategias tradicionales antes mencionadas, perjudiciales con el medio ambiente, en pro de una agricultura sostenible y respetuosa con las buenas prácticas agrícolas que respeten el entorno.

5.1 Resultados

5.1.1 Características físico-químicas y capacidad supresiva de los diferentes suelos estudiados

A continuación, se muestran los datos correspondientes a las características fisicoquímicas de los diferentes suelos estudiados (Tabla 5.1) y los parámetros relacionados con la infectividad del nematodo objeto de estudio, *Meloidogyne spp* (Tabla 5.2). Las muestras de Kyoto, Hidalgo y Castellà pertenecen a campos de cultivo que están en invernaderos, en cambio Noé está al aire libre y se sitúa más al Norte que el resto. Como se puede ver, el índice de parasitismo de los huevos es mucho más bajo en el caso de las muestras de Noé, poniendo de manifiesto el carácter conductivo de este suelo en comparación con el resto que serían supresivos para el crecimiento de dicho nematodo.

A partir de los datos de infectividad del nematodo y de parasitismo del mismo, así como los resultados obtenidos en investigaciones previas²⁰¹, se puede concluir que los suelos de las parcelas Castellà, Hidalgo y Kyoto son suelos supresivos y el perteneciente a Noé, es conductivo. En el caso de la parcela Kyoto, inicialmente se escogió porque en estudios previos se observó que era un suelo conductivo, pero los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que en la actualidad se trata de un suelo supresor y así lo consideraremos a partir de ahora.

Tabla 5.1 Características fisicoquímicas de los suelos objeto de estudio.

Parámetros fisico-químicos	Castellà	Noé	Hidalgo	Kyoto
Boro (mg/Kg)	5,33	0,75	1,12	1,21
Calcio de cambio (meq/100g)	14,88	9,98	18,16	15,89
Calcio Disponible (meq/100g)	14,7	10,74	18,99	16,96
Caliza Activa (% CaCO ₃)	4	3,8	4,1	5,1
(CIC) (meq/100g)	14,06	12,22	25,7	22,89
Cobre (mg/Kg)	2,5	28,77	2,5	2,5
CE (Extracto 1/5) (µS/cm a 20°C)	516	332	1069	415
Fósforo Disponible (mg/Kg)	247,47	86,92	75,79	80,19
Hierro (mg/Kg)	5	79,72	5	5
Magnesio de cambio (meq/100g)	4,8	1,41	2,97	2,21
Magnesio Disponible (meq/100g)	4,43	1,58	3,66	2,72
Manganeso (mg/Kg)	92,44	54,26	2,5	2,5
Materia Orgánica Oxidable (%)	4,38	2,5	2,5	4,29
Nitrógeno Dumas (mg/Kg)	2388,7	1824,9	1497,7	2209,8
pH	8,17	7,77	8,12	8,32
Potasio de cambio (meq/100g)	1,47	0,35	0,67	0,62
Potasio Disponible (meq/100g)	1,67	0,43	0,69	1,05
Relación C/N	10,64	7,94	9,68	11,26
Sodio de cambio (meq/100g)	0,57	0,36	0,54	0,37
Sodio Disponible (meq/100g)	1,85	0,54	3,17	0,62
Zinc (mg/Kg)	7,19	24,52	2,5	2,5
Textura				
Arena (%)	33	67	68	53
Arcilla (%)	29	19	32	18
Limo (%)	38	14	0	29

Tabla 5.2 Densidad poblacional de *Meloidogyne spp* en el momento inicial (siembra) y el final (recolección), índice de agallas, número de huevos en las raíces, y porcentaje de parasitismo fúngico de los huevos en los diferentes suelos en las fechas de siembra y recolección.

Lugar	Cultivo	Fechas	Juveniles / 250 cm ³ de suelo		Índice de gallas	Huevos (x10 ²) / gramo de raíz	Huevos parasitados (%)
			Inicial	Final			
Castellà	Calabacín	02/2015-07/2015	402±59	16±9	3±0,2	56,1±7,8	17,0±3,2
	Acelga	07/2015-11/2015	16±9	9±2	2,4±0,2	0,14±0,03	NM
	Espinacas	07/2015-11/2015	16±9	4±4	2±0,2	0±0	NM
	Calabacín	03/2016-07/2016	8±4	7±6	2,8±0,1	14,9±0,9	11,2±2,4
Hidalgo	Berenjena	03/2015-07/2015	16±6	20±11	0,5±0	3,1±0,4	35,9±4,4
	Lechuga	11/2015-02/2016	239±63	118±39	2,2±0,2	0,5±0,2	NM*
	Tomate	02/2016-07/2016	118±39	35±11	3,9±0,1	41,4±2,7	21,7±2,8
Kyoto	Tomate	02/2015-07/2015	55±18	42±17	8,3±0,2	31±6,9	24,8±5,5
	Rábano	08/2015-11/2015	42±17	24±14	0,47±0,1	1,5±0,2	NM*
	Sandía	03/2016-07/2016	24±14	3±2	MP [^]	MP [^]	NM*
Noé	Calabacín	04/2015-08/2015	6±2	0±0	1,3±0,2	2,5±1	0,8±0,7
	Haba	11/2015-06/2016	54±18	24±13	MP [^]	MP [^]	NM*

*NM: no se realizó muestreo
[^]NP: Muestreo posterior a la recolección

5.1.2 Análisis de la diversidad microbiana de los distintos suelos infestados con *Meloidogyne spp*

Se ha realizado un análisis de la microbiota bacteriana y fúngica asociada a ambas tipologías de suelos, supresivos y conductivos, para *Meloidogyne spp*, en diferentes épocas del año y con diferentes cultivos de hortalizas. En este caso, se hizo una primera aproximación mediante DGGE para determinar si existían tales diferencias y ver si había patrones de similitud dentro de los suelos supresivos para el nematodo fitopatógeno, y después en base a los resultados obtenidos, se seleccionaron las muestras más representativas para realizar un estudio en profundidad de la estructura

de las poblaciones bacterianas y fúngicas (diversidad alfa y beta), mediante Illumina MiSeq.

Estructura y dinámica de las poblaciones bacterianas y fúngicas a lo largo de un ciclo anual

En las figuras 5.1 y 5.2 se muestran los perfiles de DGGE obtenidos, para la comunidad bacteriana y fúngica, respectivamente. En el caso de los hongos se escindieron 141 bandas que fueron amplificadas de nuevo y 132 fueron secuenciadas por MacroGen®. En el caso de bacterias y debido a la complejidad del patrón de bandas presentes en la DGGE, no se pudieron recuperar bandas discretas con calidad suficiente como para proceder a su secuenciación.

Los patrones de bandas obtenidos por DGGE se analizaron mediante el programa informático InfoQuest® (véase apartado 2.4.1), con el objetivo de conocer la heterogeneidad de las comunidades microbianas de un determinado suelo, el grado de similitud de los distintos suelos a nivel de composición bacteriana y fúngica, así como su evolución a lo largo del tiempo. Finalmente, también se determinó la afiliación filogenética de las poblaciones fúngicas y su abundancia relativa a través de la secuenciación de las bandas recuperadas de los geles.

En la figura 5.3 se puede observar como tanto en el caso de bacterias, como en hongos Noé queda separado del resto de las muestras, 81,6% y 84,8% de diferencia para bacterias y hongos respectivamente, hecho que es previsible al ser el único suelo conductivo, además de tener un sistema de producción diferente. A continuación, en el caso de bacterias, los suelos Castellà e Hidalgo, que inicialmente eran supresivos, están más cercanos. Las muestras correspondientes al suelo de la parcela Kyoto, que como ya hemos comentado se trata de una parcela clasificada como conductiva en trabajos previos y ha acabado comportándose de forma supresora, aunque forma parte del cluster de primer orden junto con Castellà e Hidalgo, se diferencia claramente de ambos. En cambio, en el caso de las poblaciones fúngicas vemos que dentro del cluster de primer orden correspondiente a los suelos supresivos, Hidalgo y Kyoto presentan una mayor similitud entre ellos en comparación con Castellà. Dado

que las parcelas de Hidalgo y Kyoto son colindantes, en el caso de las poblaciones fúngicas, las características edáficas y ambientales tendrían más peso en la composición de las poblaciones fúngicas.

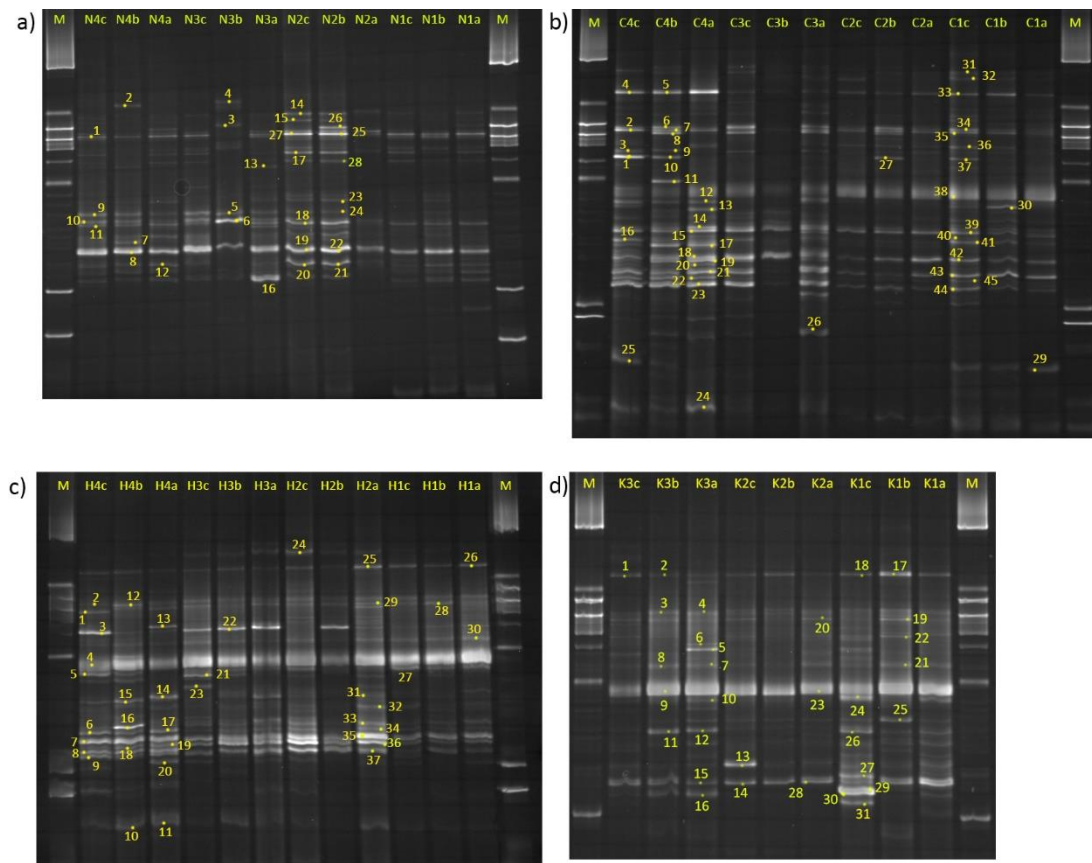


Figura 5.1 Perfiles de DGGE de las comunidades fúngicas de los suelos analizados, obtenidos a partir de la amplificación de fragmentos del ITS. a) Perfil de las muestras de Noé, b) Perfil de las muestras de Castellà, c) Perfil de las muestras de Hidalgo, d) Perfil de las muestras de Kyoto. Los números corresponden a las bandas escindidas para su posterior secuenciación. M: marcador Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

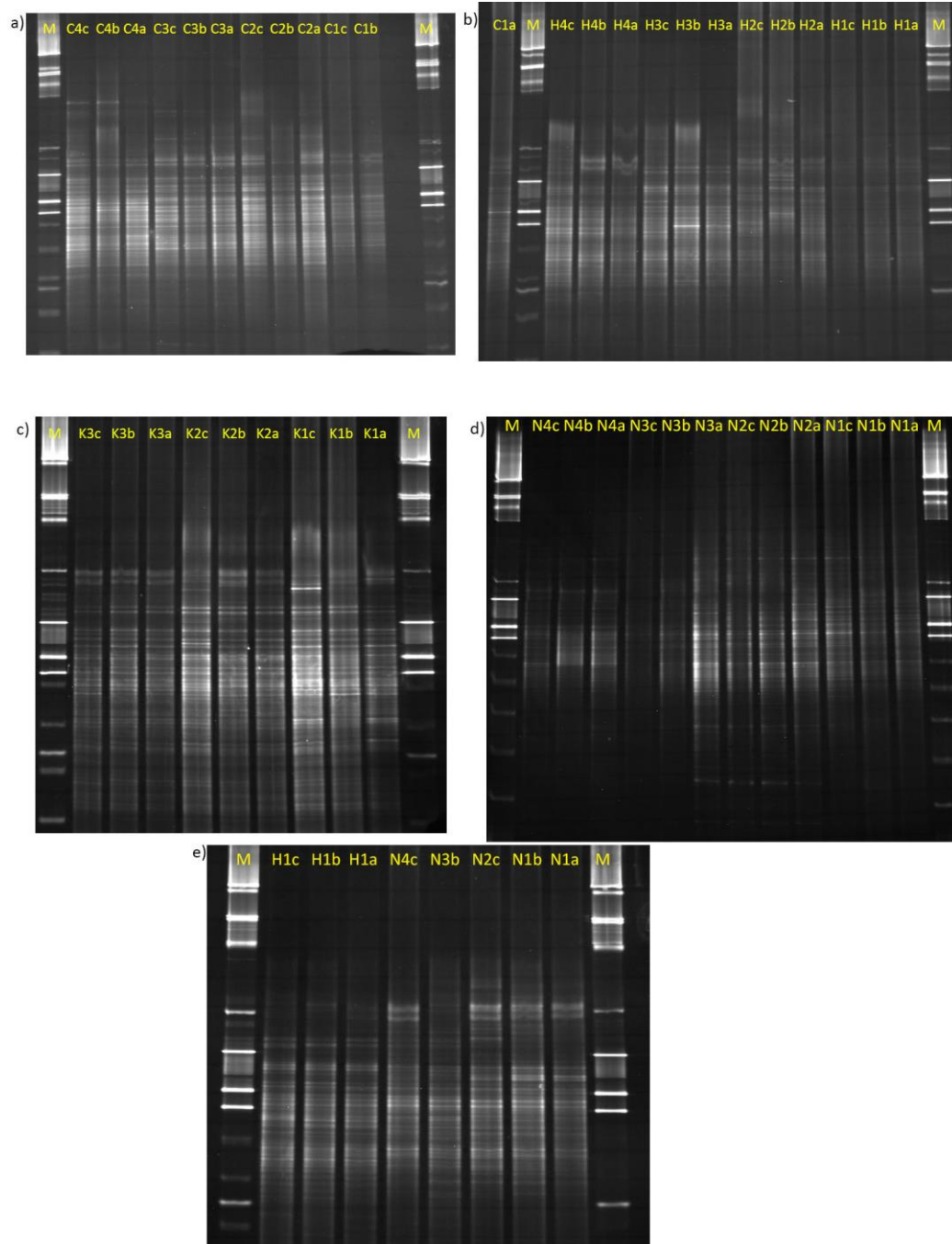


Figura 5.2 Perfiles de DGGE de las comunidades bacterianas de los suelos analizados, obtenidos a partir de la amplificación de fragmentos del RNA ribosómico 16S. a) Perfil de las muestras de la parcela Castellà, b) Perfil de las muestras de la parcela Hidalgo, c) Perfil de las muestras de la parcela Kyoto, d) Perfil de las muestras de la parcela Noé, e) Perfil de aquellas muestras que en los geles a, b, c y d, presentan una baja resolución. M: marcador. Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

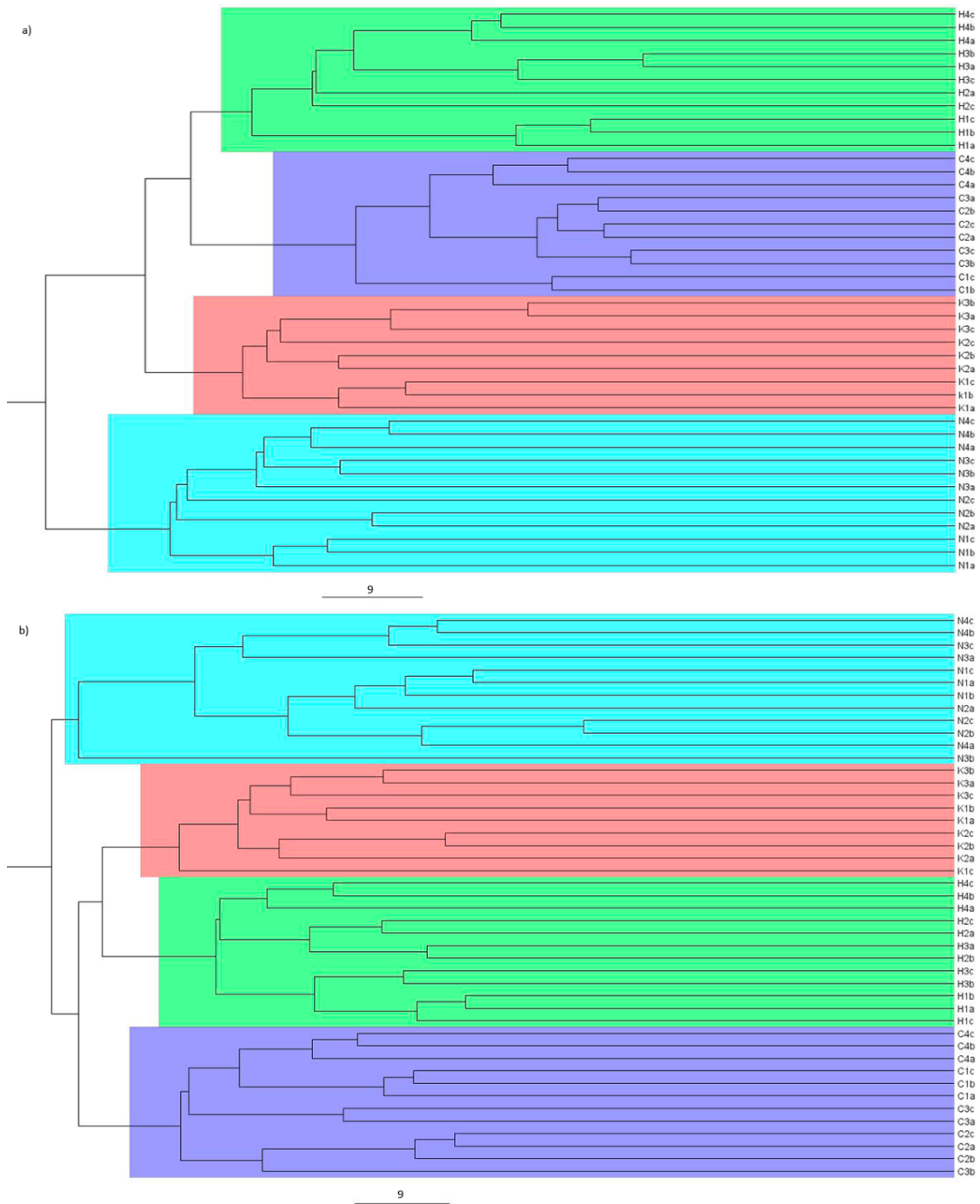


Figura 5.3 Dendrogramas realizados a partir de los perfiles DGGEs bacterianos (a) y fúngicos (b). Verde: Hidalgo, lila: Castellà, Turquesa: Noé, Salmon: Kyoto. Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

En los NMDS (Figura 5.4) vemos una agrupación similar a la mostrada en los dendrogramas. Las muestras correspondientes a los perfiles de DGGE bacterianos de la

parcela Noé se sitúan muy dispersas en el espacio geométrico, lo que evidencia una gran heterogeneidad tanto entre los diferentes muestreos realizados en el suelo esta parcela, como cuando se comparan las diferentes réplicas de los mismos. En el caso de fúngicas se observa un solapamiento entre las muestras de las parcelas Castellà y Hidalgo, los cuales ya inicialmente exhibían un comportamiento supresivo para el nematodo *Meloidogyne spp*.

Las tablas 5.3 y 5.4 muestran los índices de diversidad (*Shannon*, *Riqueza* y *Equidad*) para las poblaciones de bacterias y hongos, respectivamente. Se puede observar una diversidad menor en las muestras correspondientes a la comunidad fúngica en comparación con la bacteriana. Además, se ha de destacar que los índices para la parcela Noe son menores que los del resto de suelos estudiados.

Tabla 5.3 Índices de diversidad obtenidos a partir de los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana.

Suelo	Shannon*	Riqueza*	Equidad*
Castellà	3,072 ±0,189	26,417 ±4,480	0,943 ±0,018
Hidalgo	2,902 ±0,135	21,417 ±2,957	0,951 ±0,022
Kyoto	2,937 ±0,165	22,667 ±4,497	0,949 ±0,019
Noé	2,596 ±0,409	16,917 ±5,979	0,947 ±0,016

* Media ± desviación estandar de todos los muestreos y sus réplicas

Tabla 5.4 Índices de diversidad obtenidos a partir de los perfiles de DGGE de la comunidad fúngica.

Suelo	Shannon*	Riqueza*	Equidad*
Castellà	2,356 ±0,366	16,500 ±5,140	0,854 ±0,056
Hidalgo	2,240 ±0,189	16,417 ±2,660	0,804 ±0,044
Kyoto	2,161 ±0,314	15,667 ±3,266	0,788 ±0,059
Noé	1,860 ±0,252	11,417 ±2,783	0,775 ±0,056

* Media ± desviación estandar de todos los muestreos y sus réplicas

El análisis estadístico del contraste de medias de los distintos índices de diversidad mediante la prueba de t de Student muestra que de la parcela Noé tiene unos índices de diversidad significativamente inferiores ($p < 0,05$), si los comparamos con los suelos de las parcelas Castellà, Hidalgo y Kyoto, supresivos para el nematodo objeto de estudio, tanto para poblaciones bacterianas, como para las fúngicas (Tabla 5.5 a y b). De igual manera, si realizamos el análisis conjunto de todos los valores de las muestras de suelos supresivos y las comparamos con los de la parcela Noé, el único suelo conductivo, los correspondientes a este último también son significativamente inferiores ($p < 0,05$) (Tabla 5.5c).

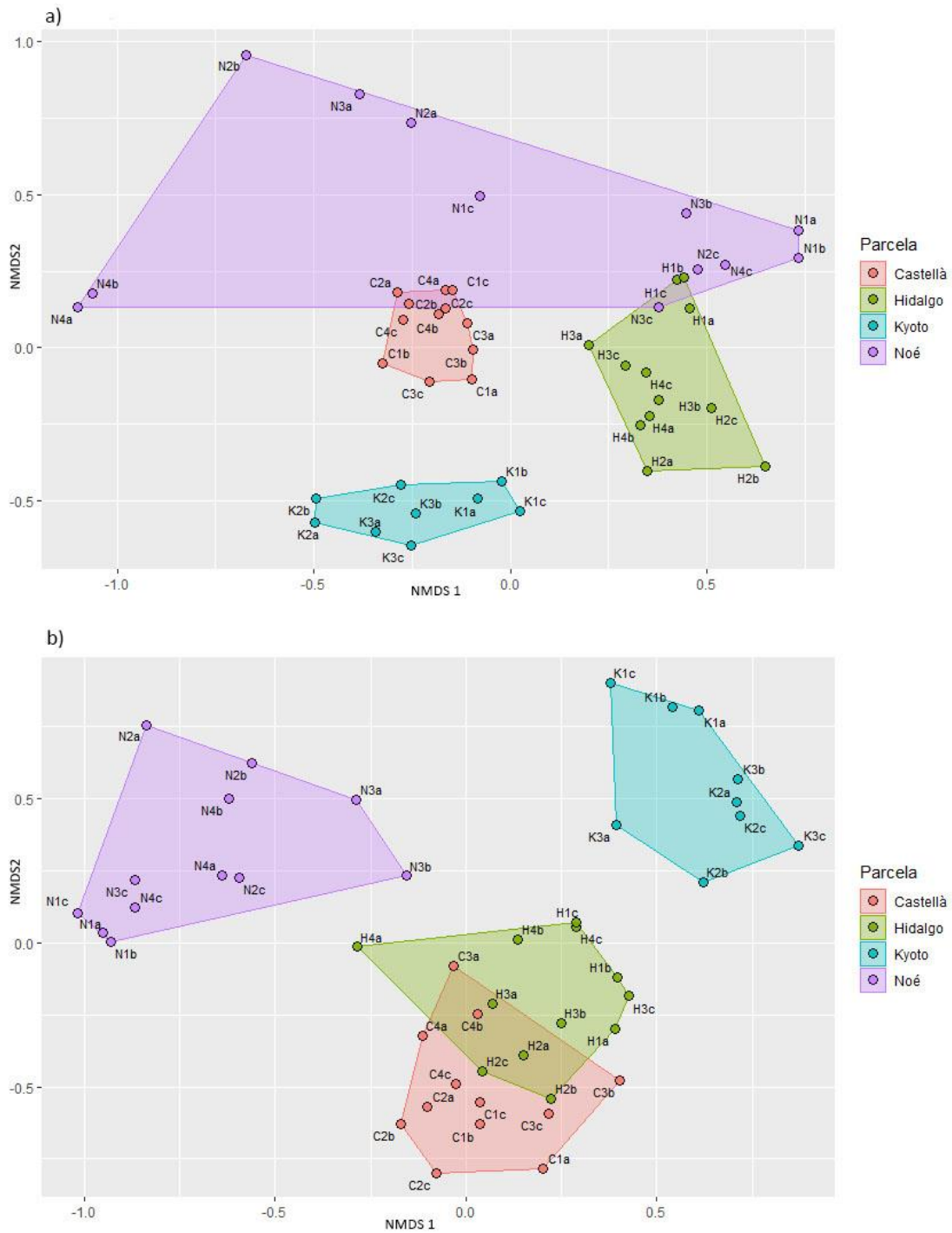


Figura 5.4 Análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) de las comunidades bacterianas (a) y fúngicas (b) de los diferentes suelos estudiados, obtenidos a partir de los perfiles de DGGE, y calculado a partir de la matriz de similitud de Bray-Curtis. Estrés 2D: 0,073. Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

Tabla 5.5 Tabla con los resultados de la prueba t de Student comparando los índices de diversidad de los diferentes suelos. a) poblaciones bacterianas b) poblaciones fúngicas c) comparación del conjunto de todos los suelos supresivos (Castellà, Hidalgo y Kyoto) con el suelo conductivo (Noé).

a)	Castellà			Hidalgo			Kyoto		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
Noé	0,003	0,000	0,572	0,034	0,040	0,694	0,024	0,033	0,872
Kyoto	0,122	0,087	0,523	0,615	0,475	0,839			
Hidalgo	0,024	0,005	0,393						

b)	Castellà			Hidalgo			Kyoto		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
Noé	0,001	0,010	0,003	0,001	0,000	0,195	0,032	0,006	0,628
Kyoto	0,238	0,690	0,023	0,505	0,588	0,518			
Hidalgo	0,365	0,962	0,028						

c)	Shannon	Riqueza	Equidad
	Bacterias	0,0095	0,0006
Hongos	0,0002	0,0007	0,0126

Las comparaciones resaltadas en negrita y sombreado son las que presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

La tabla 5.6 muestra el análisis estadístico mediante la prueba de t de Student de los índices de diversidad correspondientes a los distintos muestreos dentro de una misma parcela. Los resultados revelan una mayor homogeneidad en las muestras procedentes de la parcela Noe en comparación con el resto de parcelas objeto de estudio, cuyos índices de diversidad són más heterogéneos. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos a partir del análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) (figura 5.4), donde justamente Noé es el que presenta unos perfiles de DGGE más heterogéneos, aun teniendo unos índices de diversidad más homogéneos.

Tabla 5.6 Tabla con los resultados de la prueba t de Student comparando los diferentes momentos de recogida de muestra de la misma parcela. a) poblaciones bacterianas b) Poblaciones fúngicas.

a)	C1 [^]			C2 [^]			C3 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
C4	0,0158	0,0041	0,1273	0,3917	0,0232	0,0146	0,4306	0,0890	0,0381
C3	0,0030	0,0890	0,0381	0,9405	0,1012	0,1562			
C2	0,0022	0,0232	0,0146						

	H1 [^]			H2 [^]			H3 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
H4	0,0014	0,0018	0,1766	0,0801	0,0577	0,2024	0,3123	0,0907	0,5097
H3	0,0015	0,0001	0,1535	0,0625	0,0030	0,2121			
H2	0,0307	0,0252	0,5182						

	N1 [^]			N2 [^]			N3 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
N4	0,0413	0,0275	0,8714	0,1224	0,1382	0,9391	0,6805	0,3921	0,1978
N3	0,4593	0,5062	0,0890	0,5896	0,6524	0,1617			
N2	0,6715	0,8707	0,7800						

	K1 [^]			K2 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
K3	0,0508	0,0139	0,0250	0,0226	0,0093	0,0212
K2	0,5642	0,6675	0,5710			

b)	C1 [^]			C2 [^]			C3 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
C4	0,4748	0,1933	0,8131	0,0076	0,0007	0,4376	0,1639	0,0619	0,3314
C3	0,3384	0,3809	0,3024	0,8923	0,2508	0,2152			
C2	0,0931	0,0402	0,6526						

	H1 [^]			H2 [^]			H3 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
H4	0,0009	0,0739	0,0046	0,2678	0,4981	0,0080	0,0174	1,0000	0,0490
H3	0,0032	0,0158	0,0181	0,8227	0,4676	0,0525			
H2	0,0867	0,1708	0,2241						

	N1 [^]			N2 [^]			N3 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
N4	0,5918	0,0078	0,5660	0,6360	0,9263	0,0434	0,2959	0,2417	0,6727
N3	0,5491	1,0000	0,3655	0,3203	0,6072	0,0038			
N2	0,4964	0,5943	0,2851						

	K1 [^]			K2 [^]		
	Shannon	Riqueza	Equidad	Shannon	Riqueza	Equidad
K3	0,5526	0,8875	0,3693	0,0222	0,0390	0,0416
K2	0,0315	0,0434	0,0416			

En negrita y sombreado los que tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

^Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

Variaciones en la composición taxonómica de las poblaciones fúngicas a lo largo de un ciclo anual

De las 132 bandas recuperadas y secuenciadas por MacroGen® (South Korea), 85 fueron seleccionadas para el subsiguiente análisis, después de la edición con el programa Bioedit sequence alignment editor©²⁰², y de desechar las que estaban contaminadas o eran demasiado cortas. La diversidad fúngica detectada en el suelo de las parcelas estudiadas incluye representantes de tres filos (Ascomycota, Basidiomycota y Morteriellomycota) y 9 clases distintas dentro de éstos (Tabla S5.2).

De la misma manera que en el apartado 4.1.1 a cada conjunto de bandas se le asignó la afiliación taxonómica correspondiente. Así pues, para la comunidad fúngica se ha podido clasificar taxonómicamente el 78,56% de la intensidad total que presentan todas las bandas del conjunto de geles.

El filo más abundante en todas las parcelas estudiadas es Ascomycota representando un 67,9% de la intensidad total, seguido del filo Morteriellomycota con un 6,43% y por último el Basidiomycota con un 4,23%. La abundancia relativa de las distintas familias de hongos en los cuatro tipos de suelos estudiados se muestra en la figura 5.5. Se puede observar como la familia Microascaceae es muy abundante (14-28%) en las dos parcelas que inicialmente se consideraban supresoras, Castellà e Hidalgo, siendo casi inexistente en Noé (4%). Algo similar sucede con la familia Stachybotryaceae, la cual constituye alrededor de un 10% en las parcelas Castellà e Hidalgo y solo un 0,5% en Noé. La familia Pyromantaceae está ampliamente representada en los tres suelos supresivos (22-43%) y casi ausente en Noé (3%). Sin embargo, pasa lo contrario con la familia Cladosporiaceae que está presente en la parcela Noé (5%) y prácticamente ausente (0-0,5%) en las muestras de suelos supresivos. Mortierellaceae también se encuentra en una mayor proporción en Noé (15%), que en el resto de parcelas (0,5-7%).

En la tabla 5.7 se muestra la abundancia relativa de cada uno de los géneros identificados, en cada una de las zonas de muestreo, y en cada momento. Podemos observar que para cada parcela hay una gran heterogeneidad a nivel de composición

taxonómica cuando se comparan los diferentes momentos de muestreo, esto puede deberse a la influencia a los cambios de los parámetro ambientales²⁰³, así como a la influencia de las diferentes especies cultivadas sobre la diversidad de las poblaciones fúngicas.

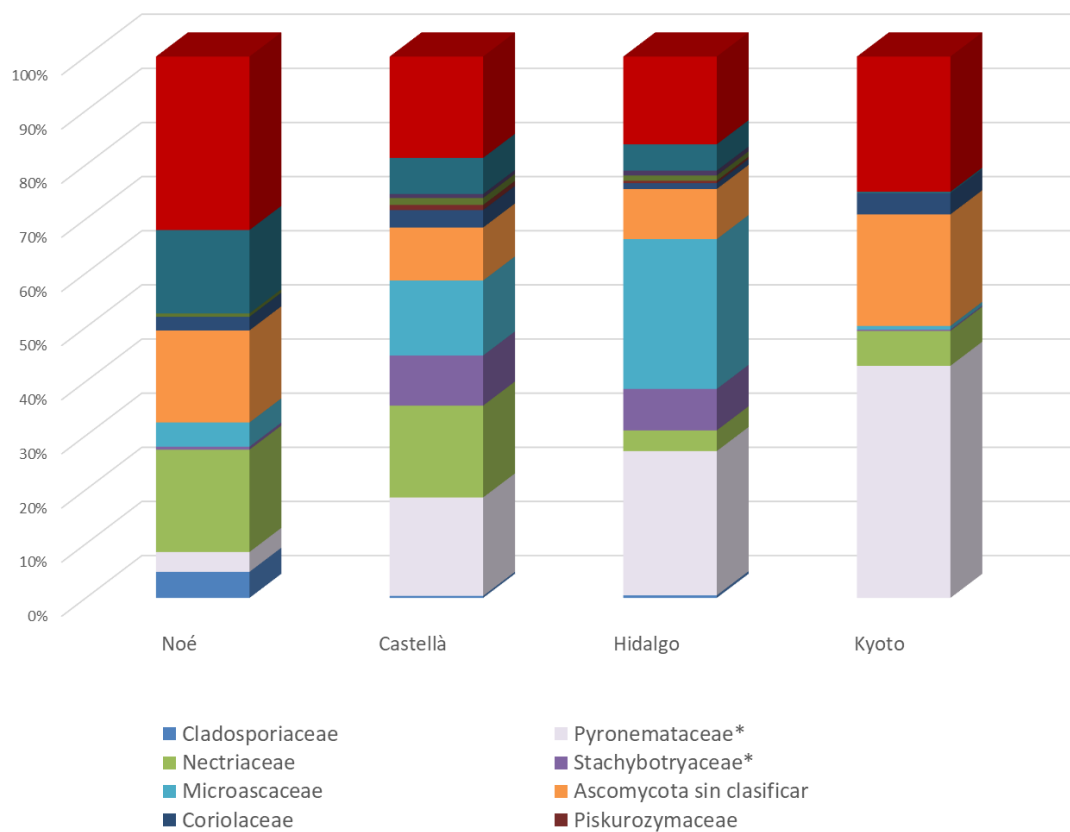


Figura 5.5 Abundancia relativa de las diferentes familias fúngicas presentes en los diferentes suelos estudiados analizadas mediante DGGE. Los táxones destacados con un asterisco son aquellos que muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se comparan las muestras de suelos conductivos con las muestras de suelos supresivos

Tabla 5.7 Abundancia relativa, expresada en %, de los diferentes géneros identificados a partir de las bandas de DGGE para cada uno de los momentos y de las zonas de muestreo.

Género ⁺	Noé				Castellà				Hidalgo				Kyoto		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
Cladosporium	5,165	1,782	11,246	2,711	0,000	0,000	1,881	0,000	0,000	0,000	0,754	1,124	0,000	0,000	0,000
Pyronemataceae sin clasificar*	4,586	4,243	1,150	2,153	18,898	27,607	12,839	5,859	22,907	3,405	3,214	2,768	4,064	33,854	28,938
Trichophaeopsis*	0,000	0,000	0,895	1,673	1,825	4,052	2,960	9,341	32,501	14,168	25,033	14,305	23,774	17,688	30,401
Fusarium	11,964	10,948	33,035	21,209	10,909	16,825	25,539	15,825	2,369	1,021	4,996	7,014	5,727	14,040	1,928
Stachybotrys*	0,000	0,000	0,000	2,309	4,725	5,990	9,305	11,604	0,000	11,789	5,948	9,290	0,000	1,050	0,000
Microascaceae sin clasificar	0,000	8,741	1,150	4,242	21,776	7,400	8,612	14,469	16,210	43,138	24,669	19,817	0,822	0,787	0,388
Ascomycota sin clasificar	4,307	17,389	36,933	4,410	12,649	16,385	12,463	6,214	10,087	6,066	7,689	13,743	23,882	21,086	15,268
Trametes	0,000	2,291	2,684	4,372	2,470	0,000	0,000	5,503	0,911	0,357	0,617	2,484	4,134	0,000	6,384
Solicoccozyma*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,419	0,000	0,693	1,446	0,000	0,357	0,000	1,171	0,000	0,000	0,000
Saitozyma	3,968	0,000	0,000	0,000	0,966	0,000	5,543	0,000	1,112	0,000	0,000	2,868	0,000	0,000	0,000
Wallemia*	0,000	0,000	0,000	0,000	1,707	2,273	0,792	0,000	0,000	1,940	1,165	0,000	0,000	0,000	0,000
Mortierella	21,635	23,076	6,773	8,419	5,433	11,205	3,356	7,438	7,526	2,507	1,891	8,451	0,000	0,656	0,475
Indeterminados	48,375	31,528	6,134	48,502	18,222	8,263	16,017	22,301	6,378	15,251	24,025	16,966	37,597	10,838	16,218

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

Los táxones con un asterisco son aquellos que muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras de suelos conductivos y muestras de suelos supresivos.

Los tres tonos de gris distinguen los porcentajes (%) de secuencias, de 0,1 a 10, de 10,1 a 20, de 20,1 a 30 y por último de 30,1 a 40; cada vez más oscuros. Las celdas sin sombreado son aquellas a las que no pertenece ninguna secuencia.

Caracterización de la diversidad bacteriana y fúngica de suelos supresivos mediante Illumina MiSeq

Para cada uno de los suelos estudiados se seleccionaron dos momentos para llevar a cabo la caracterización filogenética de las poblaciones microbianas que los integraban mediante secuenciación masiva a través la plataforma Illumina MiSeq. En todos los casos se optó por escoger el primer y el último muestreo de cada parcela y se procedió a unir los productos de PCR de las tres réplicas de cada uno, tanto en el caso de los amplicones bacterianos como para los fúngicos. Por lo tanto, las muestras analizadas fueron: N1 y N4 en el caso de Noé, C1 y C4 para Castellà, H1 y H4 para Hidalgo y K1 y K3 para Kyoto.

Caracterización filogenética de las poblaciones bacterianas

La secuenciación *MiSeq* generó 3.564.612 secuencias (tabla 5.8), después de filtrarlas, de desechar las de mala calidad, y de eliminar las secuencias inespecíficas que no correspondían al taxón estudiado (201.490 *Archeas* y 3.423 de organismos desconocidos) quedaron 1.981.787 secuencias, que son las que utilizaron en el análisis. Para construir la librería de OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) se tuvo en cuenta que las secuencias que los integraban presentaran como mínimo una similitud de un 97%, lo que nos proporcionó un total de 42.906 OTUs, desde 9.258 hasta 19.582 por muestra. Con este número de OTUs y usando el 97% de similitud obtuvimos una cobertura mínima de 0,965. Las diferencias entre el número de OTUs observados y el índice Chao para las muestras de suelos supresivos son significativamente mas elevadas que las observadas en el suelo conductivo ($p < 0,05$), y en el caso del índice de Shannon, el resultado es $p = 0,0510$ lo que es prácticamente significativo. Para los futuros análisis de β -diversidad se utilizará el mismo número de secuencias para todas las muestras, para ello se igualaron todas las muestras a la que tenía menos, que es 174.517. Las secuencias que formarían parte de cada grupo fueron escogidas al azar. En la figura 5.6 a) y b) se pueden ver respectivamente como las curvas de rarefacción prácticamente llegan a la saturación, tanto cuando consideramos todas las secuencias, como para los subgrupos de 174.517 secuencias.

Tabla 5.8 Número de lecturas de Illumina MiSeq para bacterias, OTUs e índices de diversidad.

Muestra [^]	Lecturas iniciales	Lecturas procesadas	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
C1	344.770	174.517	11.932	0,970	7,377	18927,7
C4	394.963	198.230	11.696	0,976	7,282	18160,1
H1	436.755	226.522	12.191	0,977	7,125	19190,1
H4	369.249	182.322	13.582	0,965	7,424	23508,5
K1	486.408	258.895	11.941	0,982	7,143	18532,6
K3	398.114	221.072	11.322	0,980	7,154	17399
N1	733.370	527.544	9.258	0,995	7,05	13407,5
N4	400.983	192.685	9.978	0,978	7,079	16196,6

[^]Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

El análisis de las secuencias nos permitió asignar un 80% de ellas a 23 filos (un 19,81% no pudo asignarse a ningún filo) (tabla 5.9 y figura 5.7). Los filos dominantes (número de secuencias superior a un 1%) son por orden de abundancia: Proteobacteria (22,94% de media, 15,77-28,58%), Acidobacteria (21,65% de media, 13,39-31,27%), Bacteroidetes (10,09% de media, 4,55-17,21%), Firmicutes (6,23% de media, 3,76-13,01%), Verrucomicrobia (3,43% de media, 2,11-5,20%), Planctomycetes (2,32% de media, 1,08-3,88%), Chloroflexi (1,58% de media, 1,00-2,71%) y Gemmatimonadetes (1,30% de media, 0,57-2,36%) y por último, las bacterias sin clasificar (19,81% de media, 17,67-24,185). Las Acidobacterias, son significativamente más abundantes en suelos supresivos ($p < 0,05$). Al contrario, Armatimonadetes y Chlamydiae exhiben una abundancia relativa superior en los suelos conductivos.

En la tabla 5.10 podemos ver como los géneros más abundantes en nuestras muestras son dos pertenecientes a los grupos GP4 y GP6 del filo Acidobacteria. El género *Ohtaekwangia* (Bacteroidetes) y los pertenecientes al subgrupo GP6 (Acidobacteria), así las secuencias pertenecientes al filo de las Actinobacterias sin clasificar son significativamente más abundantes en suelos supresivos que en conductivos. Por el contrario, las especies del género *Adhaeribacter* están más representados en suelos conductivos que en suelos supresivos.

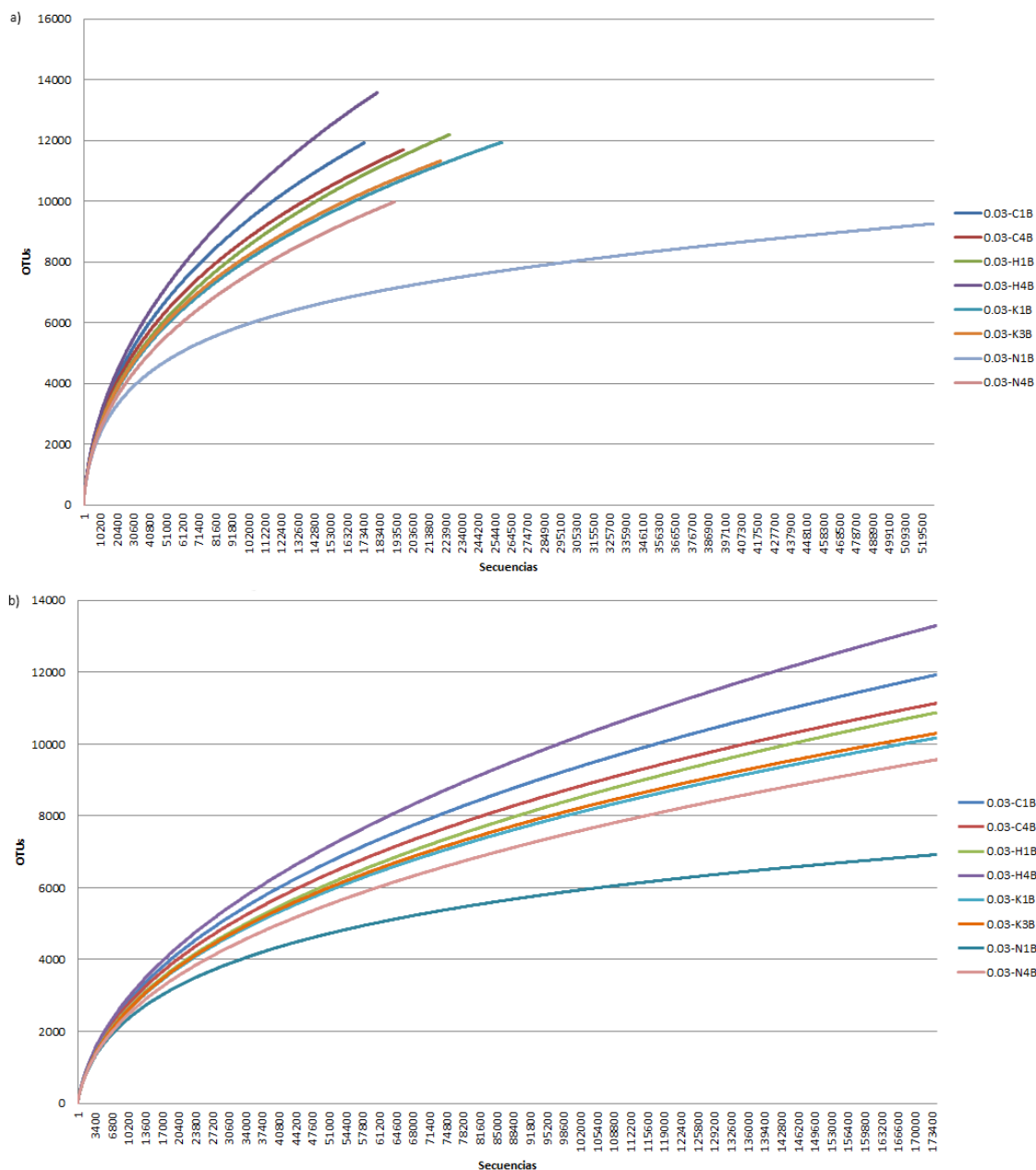


Figura 5.6 Curvas de rarefacción correspondientes a todas las secuencias (a) y a los subgrupos de 174.517 secuencias tras igualar la profundidad de lectura (b) pertenecientes a las poblaciones bacterianas de los suelos supresivos y conductivos estudiados. Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

Tabla 5.9 Número de secuencias correspondientes de cada uno de los filos bacterianos considerando todas las secuencias y desglosadas para cada una de las muestras analizadas mediante Illumina MiSeq.

Filo	Total	C1 [^]	C4 [^]	H1 [^]	H4 [^]	K1 [^]	K3 [^]	N1 [^]	N4 [^]
Proteobacteria	454507	37381	35893	35742	39478	63743	58011	150796	33463
Acidobacteria	429070	40524	46133	72111	42690	62967	53790	70659	40196
Bacteria sin clasificar	392624	36354	37746	46441	32223	53288	39886	100090	46596
Bacteroidetes	200055	12183	14952	13000	8294	21979	21715	90787	17145
Actinobacteria	188574	17996	19658	22226	19335	23741	20897	44625	20096
Firmicutes	123476	13174	23774	11508	23726	11868	9373	19859	10194
Verrucomicrobia	68006	6609	6295	8607	3853	7174	6597	18860	10011
Planctomycetes	45920	4595	6987	8792	5891	5100	3109	5682	5764
Chloroflexi	31377	1790	3599	4339	4262	3438	2218	6510	5221
Gemmatimonadetes	25739	2089	1492	1657	1034	2785	2684	12432	1566
Nitrospira	8613	1013	775	561	744	1252	1195	2394	679
Armatimonadetes	7032	305	482	845	369	622	794	2689	926
Latescibacteria (WS3)	2191	170	135	334	139	277	222	461	453
Chlamydiae	1848	177	80	68	117	201	116	892	197
Parcubacteria (OD1)	950	58	116	71	30	93	227	296	59
Deinococcus-Thermus	667	24	25	73	66	267	103	82	27
Sumerlaeota (BRC1)	583	52	71	130	47	64	113	66	40
Microgenomates (OP11)	280	1	0	1	1	3	2	251	21
Saccharibacteria (TM7)	135	13	11	6	21	31	20	6	27
Spirochaetes	75	5	4	9	1	2	0	51	3
Tenericutes	61	4	0	0	1	0	0	56	0
Chlorobi	2	0	1	1	0	0	0	0	0
Fusobacteria	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Absconditabacteria (SR1)	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Total	1981787	174517	198230	226522	182322	258895	221072	527544	192685

[^]Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

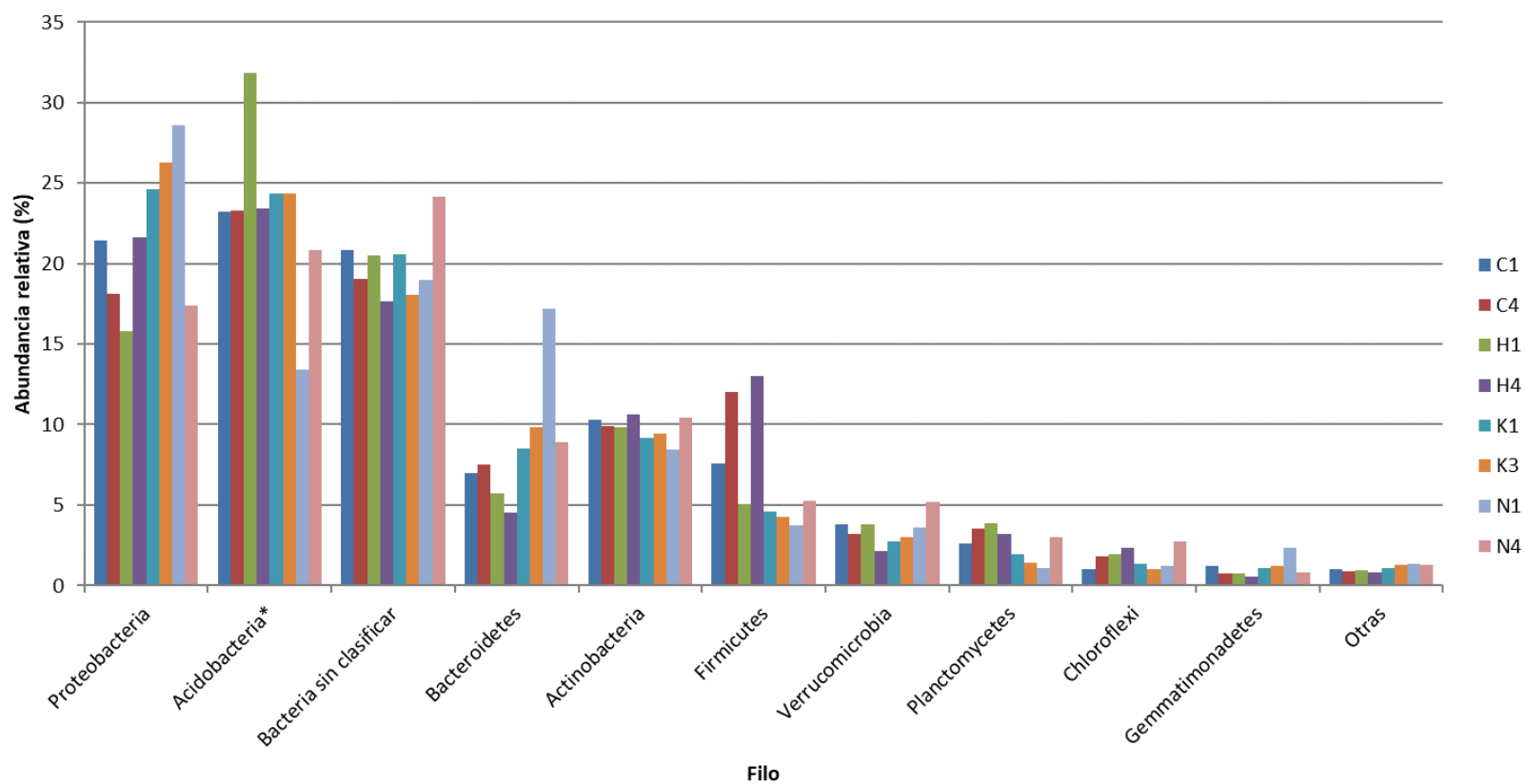


Figura 5.7 Abundancia relativa, expresada en %, de los filos más abundantes (>1%) en cada uno de los suelos y muestreos, analizados mediante Illumina MiSeq. Los filos con un asterisco presentan diferencias significativas entre las muestras de suelos supresivos y suelos conductivos. Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4)

Tabla 5.10 Abundancia relativa (%) de los géneros bacterianos más representativos (>1%) de las muestras de suelos analizados mediante Illumina MiSeq.

Género ⁺	C1B [^]	C4B [^]	H1B [^]	H4B [^]	K1B [^]	K3B [^]	N1B [^]	N4B [^]
Bacteria sin clasificar	20,83	19,04	20,50	17,67	20,58	18,04	18,97	24,18
Gp6*	13,97	13,50	21,77	16,19	14,35	13,03	5,36	8,89
Gp4	5,98	7,33	7,42	4,06	6,98	7,89	4,14	8,77
Gammaproteobacteria sin clasificar	2,88	2,17	1,97	3,00	3,59	2,86	2,91	1,88
Betaproteobacteria sin clasificar	2,66	1,57	1,74	2,36	2,42	2,70	2,86	2,07
3 géneros incertae sedis	2,61	1,69	2,62	1,20	1,81	1,81	1,91	3,22
<i>Ohtaekwangia</i> *	2,31	1,88	2,47	1,94	3,13	3,06	1,25	1,10
Bacillales sin clasificar	2,94	3,96	1,34	4,64	1,50	1,29	0,69	1,20
Chitinophagaceae sin clasificar	0,75	0,80	0,78	0,58	0,78	1,13	4,23	2,12
Bacteroidetes sin clasificar	1,32	1,50	0,95	1,00	1,32	1,27	2,77	1,69
Alphaproteobacteria sin clasificar	1,88	1,78	1,28	1,77	1,91	2,21	1,64	0,86
Actinobacteria sin clasificar *	2,38	1,28	1,63	2,13	1,98	2,17	1,10	1,08
Proteobacteria sin clasificar	1,13	1,07	1,11	1,32	1,31	1,68	1,73	0,85
<i>Gemmatimonas</i>	1,20	0,75	0,73	0,57	1,08	1,21	2,36	0,81
Rhizobiales sin clasificar	1,27	0,81	0,88	1,70	0,98	1,18	1,84	0,85
Planctomycetaceae sin clasificar	1,47	1,83	2,05	1,74	1,06	0,76	0,57	1,62
<i>Steroidobacter</i>	1,13	1,02	1,26	1,17	1,08	1,89	1,38	0,61
Myxococcales sin clasificar	1,12	1,09	1,02	1,36	0,97	0,83	1,61	0,90
<i>Adhaeribacter</i> *	0,48	0,90	0,41	0,08	0,53	1,25	2,28	1,03
Otros	31,68	36,04	28,08	35,52	32,65	33,74	40,40	36,29

*Géneros con diferencias significativas entre de suelos supresivos y conductivos. ⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

[^]Cada muestra se identifica con un código de tres caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé), el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4) y el tercero son las tres réplicas procedimentales de cada muestra (a, b y c).

Caracterización filogenética de las poblaciones fúngicas

En el caso de hongos se obtuvieron 5.958.355 secuencias (tabla 5.11), que una vez descartadas las de baja calidad y eliminadas las que no se correspondían al taxón estudiado (523 Eukaryota *Incertae sedis*, 16 de plantae y 8 lecturas inclasificables) quedaron 3.998.390. Las secuencias con un 97% de similitud o más se agruparon en OTUs (*Operational Taxonomic Unit*), y se obtuvieron 5.759 OTUs, desde 685 a 1.721 por muestra. Con el criterio utilizado para la obtención de OTUs la cobertura mínima alcanzada fue 0,997. En el caso de los hongos, no se aprecian diferencias significativas en los índices de diversidad al comparar las muestras de suelos supresivos con las de conductivos. Para los análisis de β -diversidad se igualó la profundidad de lectura para todas las muestras, así que se escogieron secuencias al azar para que todos los grupos

tuvieran el mismo número, como la muestra con menos secuencias, 228.521. En la figura 5.8a y b se pueden ver como las curvas de rarefacción para todas las secuencias y para los subgrupos de 228.521 secuencias, respectivamente, llegan a un punto cercano a la saturación.

Tabla 5.11 Número de lecturas de Illumina MiSeq para hongos, OTUs e índices de diversidad. Analizadas mediante Illumina MiSeq.

Muestra	Lecturas iniciales	Lecturas procesadas	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
C1	1858783	1345400	1721	0,999	2,958	5824,415
C4	441005	228521	685	0,998	2,780	1796,643
H1	532989	382441	916	0,998	1,823	3663,727
H4	613718	311872	1145	0,997	2,486	4861,279
K1	574502	379265	839	0,999	2,194	3362,448
K3	524471	333322	811	0,998	2,240	3426,565
N1	925039	693638	966	0,999	2,722	2536,25
N4	487848	323931	699	0,999	2,273	1584,145

^Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

Todas las secuencias fueron asignadas a un total de 10 filos, además de los hongos no clasificados (tabla 5.12), los filos dominantes (>1%) ordenados en orden decreciente en función del número de lecturas son, Ascomycota (89,54% de media, 78,26-96,65%), Mortierellomycota (7,40% de media, 1,86-17,51%) y Basidiomycota (2,40% de media, 0,35-7,08%). Estos datos son muy similares a los de afiliación a nivel de filo obtenidos a partir del análisis realizado mediante DGGE. Porcentualmente, los Ascomycota están, significativamente ($p < 0,05$) menos representados en las muestras de suelos conductivos con respecto a los supresivos. Cabe destacar el filo Olpidiomycota, que, aunque está presente en una abundancia inferior a los mencionados anteriormente (0,12%), tiene una representación significativamente superior en el micobioma de los suelos conductivos.

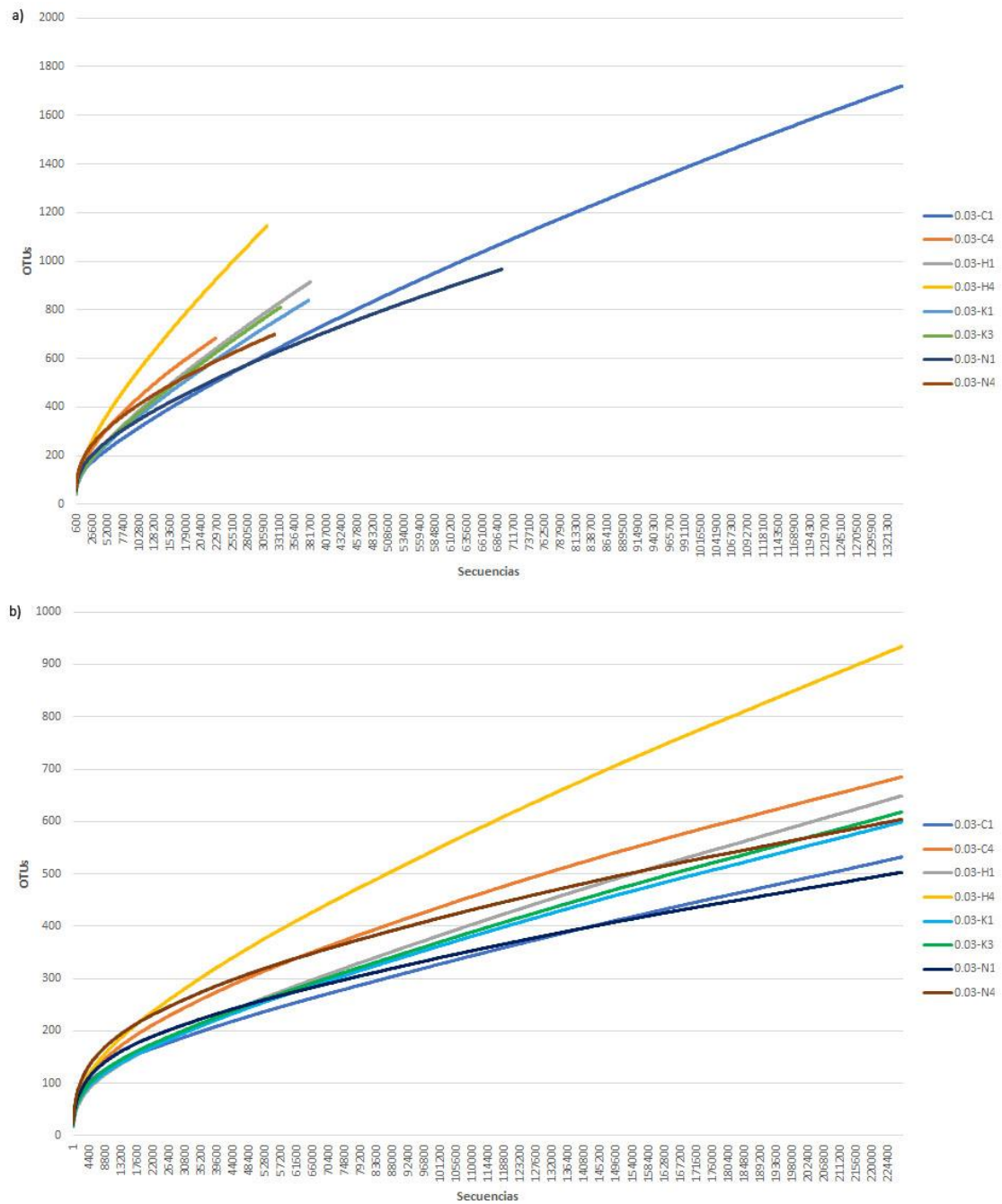


Figura 5.8 Curvas de rarefacción pertenecientes a todas las secuencias fúngicas (a) y para los subgrupos de 228.521 secuencias tras igualar la profundidad de lectura (b), analizadas mediante Illumina miSeq. Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

Tabla 5.12 Número de secuencias fúngicas de cada uno de los filos en total y en cada una de las muestras, analizadas mediante Illumina MiSeq.

Filo	Total	C1 [^]	C4 [^]	H1 [^]	H4 [^]	K1 [^]	K3 [^]	N1 [^]	N4 [^]
Hongos sin clasificar	17392	6830	941	684	1653	603	905	2812	2964
Ascomycota*	3580017	1216594	211695	358367	277323	362771	320768	542817	289682
Basidiomycota	95828	23179	803	6707	22068	8380	3676	22585	8430
Blastocladiomycota	32	0	10	0	0	0	0	0	22
Chytridiomycota	2106	43	2	36	11	23	88	1849	54
Entomophthoromycota	23	0	0	0	1	0	0	0	22
Glomeromycota	568	210	92	0	1	264	0	0	1
Mortierellomycota	295713	96950	14842	16627	10700	7052	7122	121483	20937
Mucoromycota	44	3	2	0	9	0	0	4	26
Olpidiomycota*	6619	1591	134	11	75	164	763	2088	1793
Rozellomycota	48	0	0	9	31	8	0	0	0

*Filos con diferencias significativas entre de suelos supresivos y conductivos.

[^]Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

En la tabla 5.13 y figura 5.9 se muestran los taxones dominantes (>1%), mostrándose en cada caso el taxón más específico. De esta manera, los taxones más abundantes, en orden decreciente, son *Microascaceae sp* (20,92%), *Pseudombrophila spp* (15,06%), *Nectriaceae sin clasificar* (13,56%), *Chaetomiaceae sin clasificar* (11,82%), *Gibellulopsis* (3.53%), *Fusarium spp* (3,15%), *Neocosmospora rubicola* (2.98%), *Cladosporium spp* (2.39%) y *Fusarium Buharicum* (1,46%) del filo Ascomycota; *Mortierella sp* (4,38%) y *Mortierellaceae sin clasificar*, que pertenecen al filo Mortierellomycota. Las secuencias pertenecientes a las familias *Microascaceae* y *Mortierellaceae*, así como los géneros *Pseudombrophila* y *Cladosporium* están presentes significativamente ($p < 0,05$) en un mayor porcentaje en suelos supresivos que en los conductivos. A nivel de suelos conductivos las especies del género *Fusarium* y *Gibellulopsis*, así como miembros de la familia *Nectriaceae* se presentan en un porcentaje superior que en suelos supresivos.

Tabla 5.13 Abundancia relativa (%) de los géneros fúngicos más representativos (>1%) de las muestras de suelos obtenidos a partir de Illumina MiSeq.

Género ⁺	C1	C4	H1	H4	K1	K3	N1	N4
Microascaceae sin clasificar*	18,023	24,715	24,892	36,486	45,644	34,240	4,398	3,325
Pseudombrophila*	9,895	1,332	52,408	26,918	19,569	31,845	0,144	0,066
Nectriaceae sin clasificar*	5,883	11,391	1,193	0,829	2,578	2,935	32,964	56,086
Chaetomiaceae sin clasificar	24,657	23,197	3,291	2,410	6,801	10,906	0,257	1,231
Mortierella	2,352	2,744	0,682	1,205	0,239	0,616	15,832	5,568
Gibellulopsis*	1,933	1,971	1,010	2,964	4,381	0,252	9,245	4,981
Fusarium sin clasificar*	1,344	3,301	1,268	1,957	1,286	1,179	8,539	6,602
Neocosmospora rubicola	5,674	2,239	1,112	2,263	0,995	1,377	1,378	2,513
Cladosporium*	3,917	0,869	1,177	1,939	5,180	2,419	0,243	0,242
Fusarium buharicum	3,424	5,245	0,021	0,083	0,005	0,000	0,000	0,038
Mortierellaceae sin clasificar*	1,159	2,994	2,940	1,144	1,120	0,970	0,009	0,003
Otros	21,740	20,000	10,006	21,803	12,203	13,260	26,990	19,343

*Géneros con diferencias significativas entre de suelos supresivos y conductivos. ⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico. Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

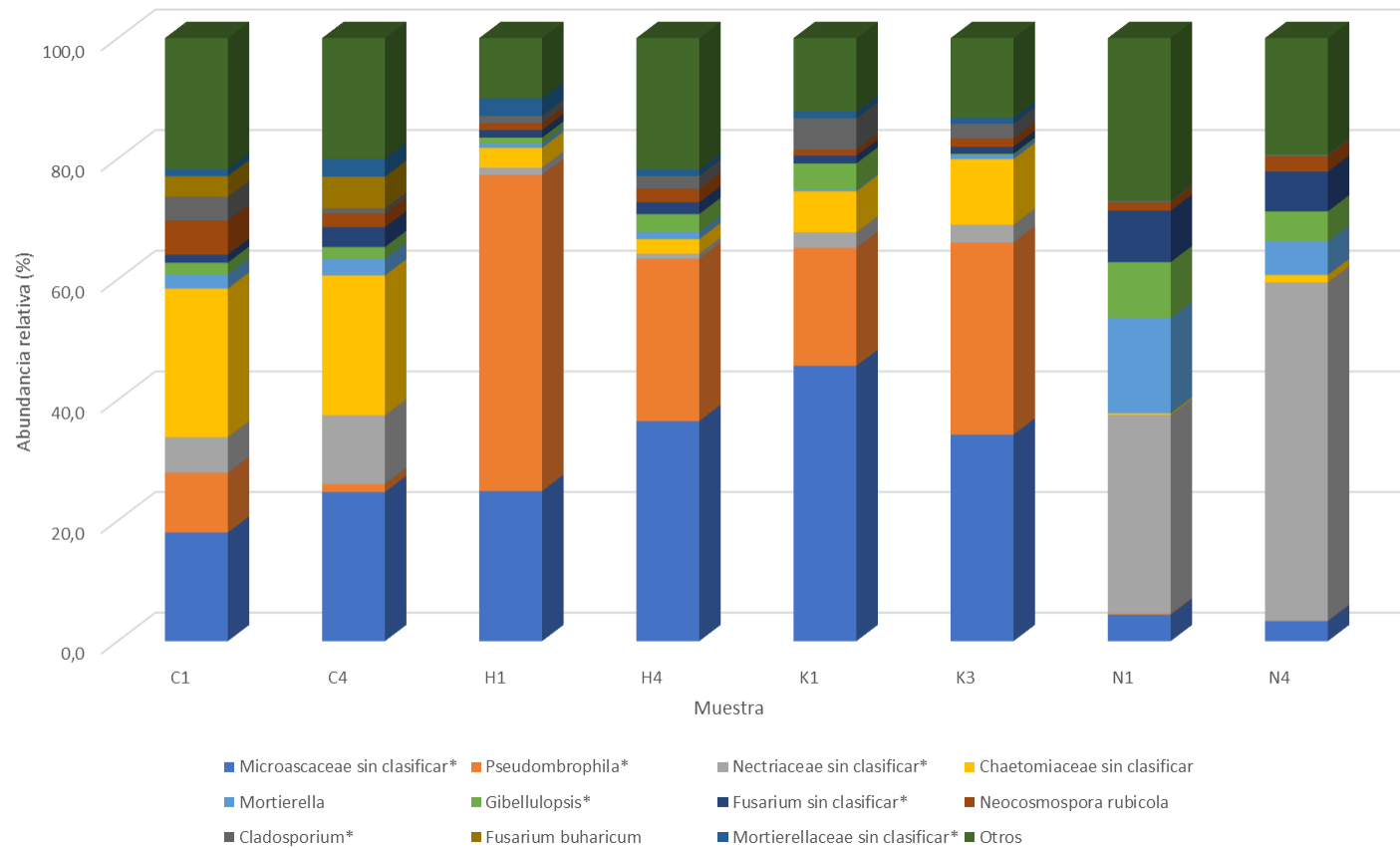


Figura 5.9. Abundancia relativa, expresada en %, de los géneros o taxón más específico clasificado más abundantes (>1%) en cada uno de los suelos y muestreos, analizados mediante Illumina MiSeq. Los filis con un asterisco presentan diferencias significativas entre las muestras de suelos supresivos y suelos conductivos. Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4)

5.1.3 Análisis estadístico de las muestras de obtenidas mediante Illumina MiSeq: Beta Diversidad

En este apartado se han realizado análisis estadísticos para saber si existen diferencias entre los suelos supresivos y los suelos conductivos para *Meloidogyne spp*. Los test estadísticos con amova en mothur muestran diferencias significativas entre el grupo de muestras correspondientes a suelos conductivos y el grupo de supresores. En la figura 5.10 se puede observar que las dos muestras pertenecientes a Noé se sitúan separadas del resto, en los dendrogramas realizados con mothur, tanto para las muestras poblaciones fúngicas como bacterinas.

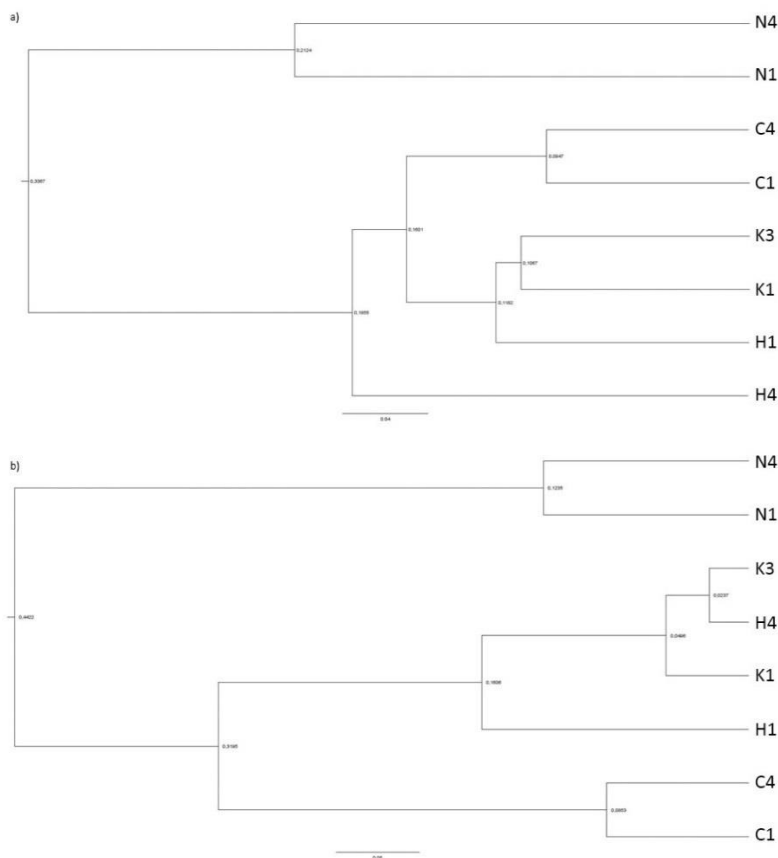


Figura 5.10 Dendrogramas con las muestras agrupadas usando el algoritmo UPGMA en base a la matriz de similitud que fue calculada con el coeficiente thetayc. a) bacterias b) hongos. Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

Cambios en la composición bacteriana entre los diferentes tipos de suelo

Utilizando el algoritmo LEfSe se obtienen los OTUs que son los que explicarían la condición de supresividad y conductividad de los suelos, pudiendo inferir así, la afiliación taxonómica y la abundancia de estos biomarcadores (tabla S5.2). En la figura 5.11 se muestra el sumatorio de secuencias de cada uno de los filos representativas para los suelos con capacidad supresora o para la conductividad. Se puede ver una representación mucho mayor del filo Acidobacteria en los suelos supresivos, hecho que ratifica lo que ya se intuía a partir del análisis de secuencias totales, donde se obtuvieron unas diferencias significativas entre el número de secuencias entre ambas tipologías de suelo, concretamente para el subgrupo Gp6, cosa que también podemos observar tras la realización del análisis con LEfSe. Por otro lado, se obtuvo un mayor número de secuencias representativas del filo Bacteroidetes en las muestras de suelos conductivos, mientras que, respecto de las secuencias totales, se evidencian diferencias significativas en el género *Adhaeribacter*, que pertenece a dicho filo.

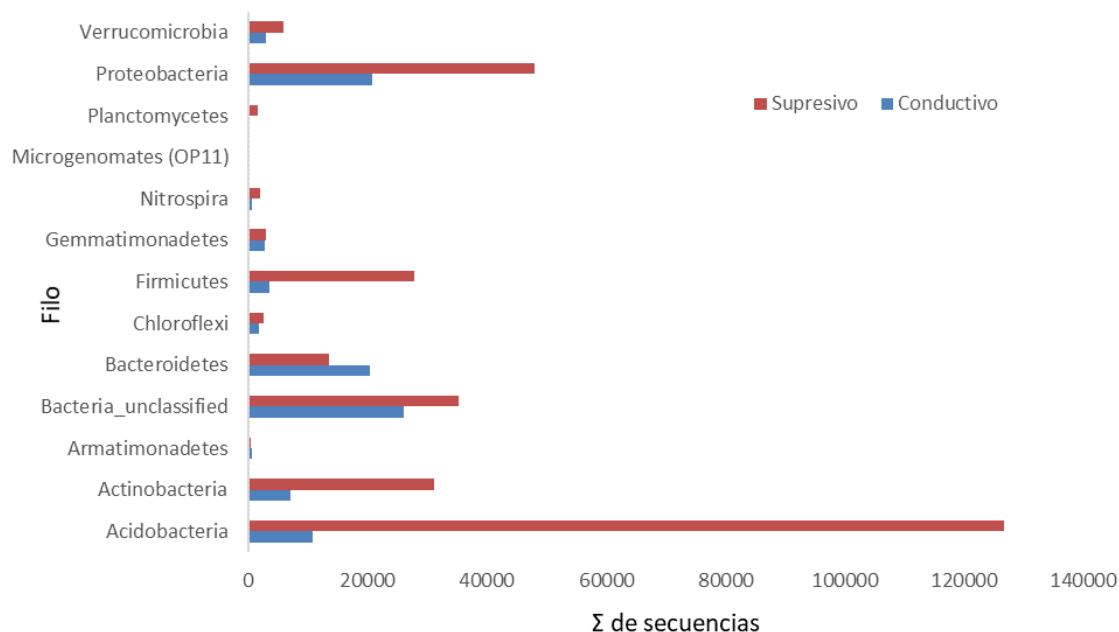


Figura 5.11 Número de secuencias de los filos bacterianos que son representativos para cada uno de los supuestos (supresivo y conductivo). Datos obtenidos mediante Illumina MiSeq y analizados según el algoritmo LEfSe.

El algoritmo de FAPROTAX nos permite inferir el número de secuencias de las muestras analizadas que pertenecen a microorganismos a los que se les atribuye la capacidad de realizar una actividad concreta. En la tabla S4.3 se muestran todas las funciones analizadas mediante FAPROTAX que se asocian al menos a una secuencia de las obtenidas en este estudio. En la figura 4.12 se detallan las funciones para las que existe una diferencia significativa entre el número de secuencias presentes en las muestras de suelos supresivos y las de suelos conductivos. Se pueden observar diferencias significativas para varias funciones, siendo la abundancia en secuencias superior en suelos conductivos, a excepción de la función oxidación de manganeso. Cabe resaltar que la capacidad que presenta más diferencias entre ambos tipos de suelos es la de parásitos intracelulares.

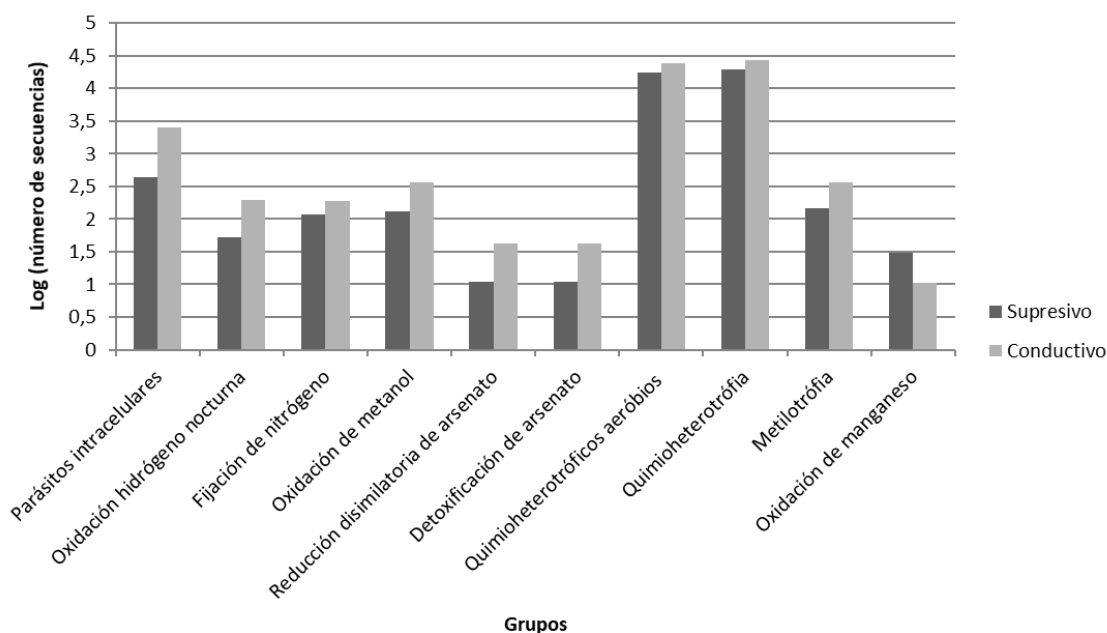


Figura 5.12 Funciones analizadas mediante FAPROTAX para las que se obtienen diferencias significativas en el número de secuencias entre los suelos supresivos y conductivos objeto de estudio. Número de secuencias en escala logarítmica.

Finalmente, se ha utilizado la herramienta Microbiome de R para explorar el microbioma *core*. En la tabla 5.14 se muestran los filotipos que configuran el *core* del conjunto de todas las muestras juntas, lo que se podría denominar un *core* global y unos filotipos extras que sumados a los otros configuran el *core* de los suelos

supresivos. El *core* de los suelos analizados está constituido por nueve filos diferentes. Cabe resaltar el género *Sporosarcina*, que solo forma parte del *core* suelos supresivos.

Tabla 5.14 Filotipos bacterianos que conforman el microbioma *core* global y para los suelos con capacidad supresiva analizados en este estudio mediante la herramienta Illumina MiSeq.

Filotipo	Tamaño	Afiliación taxonómica		Global	Supresivo	
		Filo	Género ⁺			
1	392624	Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar			
2	241348	Acidobacteria	<i>Gp6</i>			
3	123444	Acidobacteria	<i>Gp4</i>			
4	53845	Proteobacteria	Gammaproteobacteria sin clasificar			
5	37155	Firmicutes	Bacillales sin clasificar			
6	24525	Planctomycetes	Planctomycetaceae sin clasificar			
7	26888	Proteobacteria	Proteobacteria sin clasificar			
8	33088	Proteobacteria	Alphaproteobacteria sin clasificar			
9	32076	Actinobacteria	Actinobacteria sin clasificar			
10	47275	Proteobacteria	Betaproteobacteria sin clasificar			
11	41017	Verrucomicrobia	3 generos <i>incertae sedis</i>			
12	23477	Proteobacteria	Myxococcales sin clasificar			
13	33321	Bacteroidetes	Bacteroidetes sin clasificar			
14	40422	Bacteroidetes	<i>Ohtaekwangia</i>			
15	25386	Proteobacteria	Rhizobiales sin clasificar			
16	36652	Bacteroidetes	Chitinophagaceae sin clasificar			
17	18327	Chloroflexi	Chloroflexi sin clasificar			
18	10353	Actinobacteria	Actinomycetales sin clasificar			
19	25739	Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>			
20	19046	Acidobacteria	<i>Gp3</i>			
21	24404	Proteobacteria	<i>Steroidobacter</i>			
86	11839	Firmicutes	<i>Sporosarcina</i>			

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

Cambios en la composición de la comunidad fúngica entre los diferentes tipos de suelo

En la tabla S5.4 se muestran las especies fúngicas y el número de secuencias pertenecientes a estas, que son las que explicarían la condición de supresividad y conductividad de los suelos, obtenidas mediante el algoritmo LEfSe. En la figura 5.13 se puede observar el sumatorio de secuencias de cada uno de estos taxones de las secuencias representativas para las condiciones de supresividad y conductividad. *Cladosporium halotolerans* (Dothideomycetes), *Pyrenochaeta lycopersici* (Dothideomycetes), *Arachniotus dankaliensis* (Eurotiomycetes), *Pseudogymnoascus* (Leotiomycetes), *Pseudombrophila* (Pezizomycetes), son los representantes de los 5

taxones presentes en suelos supresivos que no aparecen como biomarcadores en los conductivos, así como los representantes sin clasificar de 3 familias Pyronemataceae, Microascaceae y Chaetomiaceae; todos ellos pertenecientes al filo Ascomycota. Además, hay dos especies que también aparecen asociadas a la condición de supresividad, que pertenecen al filo Mortierellomycota, *Mortierella alpina* y *Mortierella oligospora*. No obstante, el filo Mortierellomycota presenta un mayor número secuencias representativas en los suelos conductivos, donde no es posible clasificar la especie. Además, solo aparecen secuencias pertenecientes a los filos Basidiomycota, Chytridiomycota y Olpidiomycota cuando se vinculan a la condición de conductividad.

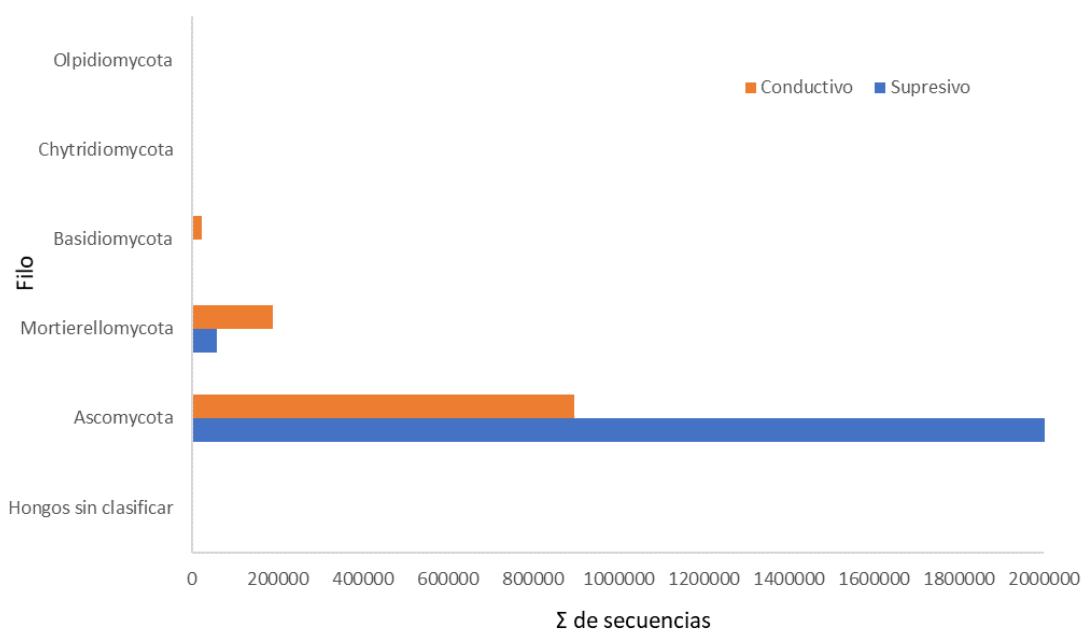


Figura 5.13 Abundancia relativa (%) de secuencias fúngicas de los taxones que son representativos para cada uno de los supuestos, según el algoritmo LEfSe.

Para la comunidad fúngica también se ha realizado los mismos estudios de microbioma *core*, utilizando los mismos parámetros que para la comunidad bacteriana (tabla 5.15). El microbioma *core* de las muestras de suelos supresivos consta de filotipos correspondientes a dos filos, mientras que el core del microbioma global está constituido por secuencias perteneciente a un solo filo. El *core* global lo forman 4

taxones del filo Ascomycota: *Fusarium spp*, *Neocosmospora rubicola* y secuencias de dos familias (Microascaceae y Nectriaceae). Además de los taxones presentes en el *core* global, vemos que los representantes del filo Mortierellomycota también forman parte del microbioma *core* de suelos supresivos, así como dos géneros, *Pseudombrophila*, *Cladosporium* y miembros de la familia Chaetomiaceae, incluidos en el filo Ascomycota. Estos tres taxones pertenecientes al filo Ascomycota coinciden con aquellos representativos de suelos supresivos mediante LEfSe.

Tabla 5.15 Filotipos fúngicos que conforman el microbioma *core* global y para los suelos con capacidad supresiva analizados en este estudio mediante la herramienta Illumina MiSeq.

Filotipo	Tamaño	Afilación taxonómica		Global	Supresivo
		Filo	Especie ⁺		
1	602123	Ascomycota	<i>Pseudombrophila spp</i>		
2	836463	Ascomycota	Microascaceae sin clasificar		
3	126004	Ascomycota	<i>Fusarium</i> sin clasificar		
4	472760	Ascomycota	Chaetomiaceae sin clasificar		
6	542223	Ascomycota	Nectriaceae sin clasificar		
9	118831	Ascomycota	<i>Neocosmospora rubicola</i>		
19	95417	Ascomycota	Cladosporium sin clasificar		
31	44800	Mortierellomycota	Mortierellaceae sin clasificar		

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

5.2 Discusión

En este apartado se ha realizado un estudio comparativo de la diversidad bacteriana y fúngica de la rizosfera de suelos conductivos y supresivos para el nematodo *Meloidogyne spp*. El análisis estadístico de los resultados permite concluir que hay diferencias significativas en la mayoría de los aspectos estudiados (índices de diversidad, taxones abundantes, biomarcadores y *core*) entre las muestras pertenecientes a la parcela Noé con respecto a las muestras pertenecientes al resto de los suelos analizados (figuras 5.3, 5.4, 5.10 y tablas 5.3, 5.8 y 5.12). Al igual que en otros estudios relativos a suelos supresivos^{204,205} la diversidad de estos es superior a la de los conductivos, sobre todo respecto a la comunidad bacteriana. El análisis mediante NMDS y de cluster revela una evidente separación entre las comunidades

pertenecientes a cada uno de los suelos analizados, tanto para el estudio mediante DGGE como para Illumina MiSeq.

Existen diversos factores clave, tanto bióticos y como abióticos, que determinan la composición de la microbiota asociada a la planta, y su evolución a lo largo del tiempo. Este efecto se evidenció en forma de una elevada heterogeneidad de las muestras pertenecientes a un mismo suelo cuando se analizaron en diferentes momentos, tal y como se observa en el análisis NMDS (Figura 5.4), en las diferencias entre los índices de diversidad para las muestras a distintos tiempos (Tabla 5.6) y en la representación taxonómica (Tabla 5.7). Por lo tanto, una caracterización taxonómica robusta no puede consistir en un análisis puntual de una sola muestra. De esta manera, para el análisis mediante Illumina MiSeq se escogieron dos muestras que exhibieron marcadas diferencias en el análisis mediante DGGE.

En cuanto a las poblaciones bacterianas, tanto a nivel de abundancia relativa como mediante el método LEfSe, las Acidobacterias como filo, y el subgrupo GP6 dentro de estos, son los que en mayor medida están representados en suelos supresivos, por encima de los conductivos, y determinan su naturaleza supresiva. Diversos estudios han demostrado una presencia más elevada de Acidobacterias en las rizosferas de suelos con capacidad supresiva para enfermedades del suelo^{204,205}. Se han reportado varios genes como la policétido sintasa (PKS) y el de la glicosilación de macrólidos presentes en las Acidobacterias y necesarios para la síntesis de productos antimicrobianos²⁰⁶. El subgrupo GP6 se ha detectado en suelos supresivos de enfermedades transmitidas por el suelo, como el tizón del pimiento¹¹⁹ o contra el patógeno *Fusarium oxysporum*²⁰⁷. También encontramos otro subgrupo del filo Acidobacteria, el *Gp4*, que ha sido reseñado en otros trabajos como perteneciente a suelos típicamente supresivos²⁰⁴. Los siguientes géneros *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Blastopirellula*, *Pelagibius*, *Pusillimonas*, *Nitrosomonas*, *Halomonas*, *Serpens*, *Lysobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Virgibacillus*, *Ammoniphilus*, *Pasteuria*, *Thermoactinomyces* se han revelado como representativos de suelos supresivos, mediante el algoritmo LEfSe. De todos ellos, varios tienen condición de agentes de control biológico, que serán reseñadas a continuación.

Lysobacter se ha relacionado con la capacidad supresora de enfermedades bacterianas y fúngicas en otros trabajos y puede utilizarse como un buen bioindicador de la salud del suelo^{208,209}. Los miembros del género *Pasteuria* pueden tener propiedades como agentes de control biológico²¹⁰, de hecho a *Pasteuria penetrans*, se le ha atribuido capacidad supresora contra *Meloidogyne arenaria* en raíces del árbol del cacahuete²¹¹. *Rubrobacter* también se ha encontrado en suelos supresivos para enfermedades del suelo²¹². *Halomonas* y *Halobacillus*, son bacterias endófitas de plantas, que se sitúan en la rizosfera y promueven el crecimiento de la planta, su resistencia a estrés y su actividad contra la invasión patógena²¹³⁻²¹⁷. *Pseudoxanthomonas* se encuentra en la rizosfera²¹⁸, de hecho *Pseudoxanthomonas japonensis* ha probado ser una bacteria supresora de *Meloidogyne incognita*²¹⁹ en tomatas. *Virgibacillus* se ha aislado de sistemas agrícolas²²⁰, y tiene capacidad antimicrobiana²²¹, asimismo, a algunas especies como *Virgibacillus dokdonensis*, una especie de origen marino, se le ha probado capacidad antagonística sobre *Meloidogyne incognita*²²². Estos microorganismos detectados como biomarcadores de la condición supresiva serían un buen punto de partida para posteriores estudios sobre el control de enfermedades de nematodos fitopatógenos. No obstante, no se debería descartar las sinergias que se establecieron con el resto de miembros de la comunidad, ni la existencia de otros microorganismos con estas capacidades.

Mediante la herramienta Microbiome, se ha encontrado un solo género que forma parte del *core* de suelos supresivos y no del de suelos conductivos, *Sporosarcina*, un miembro del filo Firmicutes que se ha vinculado también a suelos supresivos para el tizón del pimiento¹¹⁹.

Una mayor presencia de Bacteroidetes en los suelos conductivos que en los supresivos también ha sido descrita anteriormente²⁰⁴. La familia Sphingobacteriaceae²⁰⁵, y concretamente los géneros *Pedobacter* y *Chitinophaga* aparecen en el LEfSe (tabla S5.2) como biomarcadores para los suelos conductivos, ambos caracterizados como simbioses de nematodos²²³.

Respecto a la comunidad fúngica, los estudios de fingerprinting (DGGE), muestran cuatro géneros altamente representados en suelos supresivos (Figura 5.5 y tabla 5.7).

Dos de ellos, *Trichophaeopsis* (Pezizomycetes) y *Stachybotrys* (Sordariomycetes), que pertenecientes al filo Ascomycota, cuyos filtrados tienen capacidad lítica sobre larvas de *Meloidogyne*²²⁴; y los otros, *Solicoccozyma* (Tremellomycetes) y *Wallemia* (Wallemiomycetes), integrantes del filo Basidiomycota

En cuanto a los resultados de abundancia relativa de las poblaciones fúngicas, obtenidos mediante Illumina Myseq, se observa que las secuencias del filo Ascomycota están en menor proporción en suelos conductivos. Por el contrario, secuencias del filo Olpidiomycota, son más abundantes en suelos conductivos. Un análisis en profundidad de los datos muestra que hay dos géneros, *Pseudombrophila* y *Cladosporium*, con una presencia significativamente superior en suelos supresivos. Por otro lado, los géneros *Fusarium* y *Gibellulopsis* aparecen más en suelos conductivos. Podría sorprender la presencia de *Fusarium* en estos suelos, ya que es conocido como antagonista de diferentes patógenos vegetales, aunque también es verdad que algunas de las especies no beneficiosas, son infecciosas²²⁵.

El estudio mediante LEfSe nos confirma que el filo Ascomycota es representativo de suelos supresivos, y dentro de ellos, las clases Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Pezizomycetes, Sordariomycetes. De hecho, los resultados obtenidos mediante DGGE muestran que dos de las especies más abundantes en suelos supresivos ya pertenecían a estas clases. Los 5 géneros más representativos son: *Cladosporium* (Dothideomycetes), *Pyrenochaeta* (Dothideomycetes), *Arachniotus* (Eurotiomycetes), *Pseudogymnoascus* (Leotiomycetes), *Pseudombrophila* (Pezizomycetes). Cuando se realiza el estudio para establecer el microbioma core, se observa que los taxones que forman parte exclusivamente del core de suelos supresivos, ya se han mostrado como representativos de este tipo de suelos en el estudio realizado mediante LEfSe, y estos son los dos géneros *Pseudombrophila*, *Cladosporium* y la familia Chaetomiaceae todos pertenecientes al filo Ascomycota. *Cladosporium* es un hongo endófito de plantas²²⁶, y aunque hay especies reportadas como infectivas, algunas han sido usadas como agentes de control biológico contra *Puccinia horiana*²²⁷ y en concreto *Cladosporium halotolerans*, que es el que se encuentra mediante LEfSe, contra *Fusarium graminearum*²²⁸ y además está presente

en multitud de trabajos sobre suelos supresivos contra *Meloidogyne spp*^{201,229,230}. *Mortierella alpina*, también puede tener un gran peso en el efecto supresivo del suelo, ya que es una especie que también aparece como biomarcador de este tipo de suelos en el análisis LEfSe y es conocida su capacidad supresiva frente a *Meloidogyne*²³¹.

A pesar de que algunos de los trabajos mostrados en esta discusión se refieren a suelos supresivos para otras enfermedades y no para la producida por *Meloidogyne spp*, se han considerado de utilidad ya que algunas de las estrategias de suprimir la enfermedad se basan en mejorar la salud del suelo y de la planta y no tienen por qué ser específicas del organismo que produce la enfermedad. Además, puede haber rutas de supresión de diferentes enfermedades que sean similares.

Capítulo 6. Impacto de la inoculación de *Trichoderma asperellum*, agente de biocontrol contra *Meloidogyne incognita*, sobre el microbioma de la rizosfera de *Solanum lycopersicum*

En este capítulo se ha estudiado el posible efecto alterador de la inoculación de *Trichoderma asperellum*, un conocido agente de control biológico para el nematodo formador de agallas del género *Meloidogyne*, sobre la microbiota asociada a la rizosfera de *Solanum lycopersicum* (tomatera). Para ello se realizó un ensayo en maceta con suelos supresivos para el patógeno procedentes de las dos parcelas mostraron un carácter supresivo más eficiente y estable en estudios previos, Castellà e Hidalgo (véase tabla 5.2 del capítulo 5). Además se han utilizado dos variedades de tomatera, una resistente (Monika) y la otra susceptible (Durinta) a *Meloidogyne incognita*²³². El objetivo del ensayo fue determinar la influencia de la variedad vegetal sembrada sobre la composición del microbioma de los suelos supresivos; así como si la inoculación del agente de control, *Trichoderma asperellum*, causa alguna modificación sobre la comunidad microbiana asociada a la rizosfera, a la vez que se realiza un seguimiento de la persistencia del agente de biocontrol para ver si prevalece, o por el contrario desaparece. Este estudio se ha realizado conjuntamente con el grupo de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la UPC dirigido por el Dr. Sorribas.

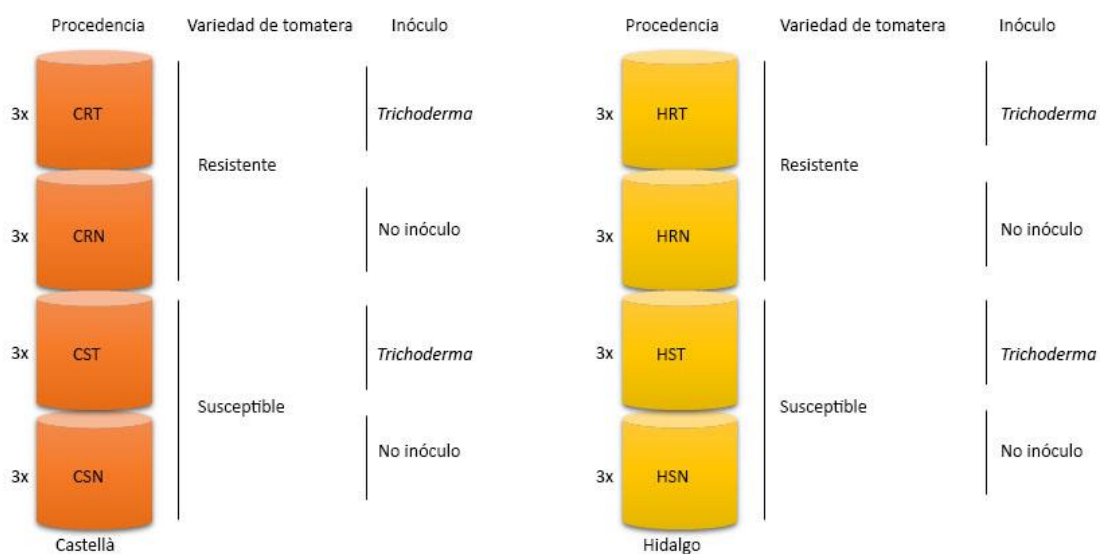


Figura 6.1 Esquema del ensayo realizado en maceta. Cada una de las macetas está identificada por un código de tres letras, la primera de las cuales indica el suelo utilizado (C: Castellà, H: Hidalgo); la segunda se refiere a la variedad de tomatera sembrada (R: Variedad de tomatera resistente (Monika), S: Variedad de tomatera susceptible (Durinta)) y la última señala si se ha inoculado con el agente de biocontrol (T: con inóculo de *Trichoderma*, N: Sin inóculo de *Trichoderma*).

En la Figura 6.1 se muestra el esquema del diseño experimental del ensayo realizado por triplicado, tomando en consideración tres variables (tipo de suelo, variedad vegetal sembrada y ausencia/presencia del agente de biocontrol). Dicho ensayo se llevó a cabo en maceta. Concretamente se emplearon 24 macetas, la mitad con cada tipo de suelo. A su vez, para tipo de suelo, 6 macetas se sembraron con una variedad de tomatara resistente al patógeno, Monika y las otras seis con la variedad Durinta, sensible al patógeno. Finalmente, de las 6 macetas que presentaban el mismo tipo de suelo y la misma variedad de tomatara, el 50% fueron inoculadas con *Trichoderma asperellum*, un agente conocido de biocontrol contra *Meloidogyne spp.*^{233–235}. En resumen, se trabajó con tres repeticiones de ocho condiciones diferentes, a las que se ha de sumar una maceta correspondiente al momento inicial de cada tipo de suelo, antes del inóculo de *Trichoderma asperellum*, y de sembrar la variedad de tomatara, siendo 26 el número final de muestras a analizar. El inóculo de *Meloidogyne* se realizó a razón de 1 juvenil de *Meloidogyne incognita* en fase J2 por cm³. El análisis de la comunidad fúngica y bacteriana se realizó mediante secuenciación masiva, mediante Illumina MiSeq, para cada una de las réplicas. A cada una de las muestras analizadas se les asignó un código de 5 caracteres (Tabla 6.1), exceptuando las dos iniciales, que tenían un código de tres caracteres que hacen referencia a la comunidad estudiada, la procedencia del suelo y el número de réplica.

Tabla 6.1 Resumen de los códigos utilizados para la identificar cada una de las muestras del ensayo.

Comunidad		Procedencia del suelo		Variedad de tomatara		Inóculo		Réplica		
Bacterias	Hongos	Castellà	Hidalgo	Resistente	Susceptible	<i>Trichoderma</i>	Ninguno			
B	F	C	H	R	S	T	N	1	2	3

6.1 Resultados

6.1.1 Índices de diversidad y grupos taxonómicos dominantes

En este apartado se describen los resultados correspondientes al análisis global de las muestras del suelo rizosférico, para poder determinar los microorganismos dominantes, así como para calcular los índices de diversidad cada condición ensayada. Finalmente, se han comparado estos datos mediante un análisis estadístico con el propósito de determinar si hay diferencias significativas entre las variables estudiadas (procedencia del suelo, variedad de tomatara plantada y presencia o ausencia del inóculo de *Trichoderma asperellum*). Seguidamente, se describen los resultados para cada comunidad analizada.

Bacterioma

El número de secuencias obtenido en el análisis mediante Illumina MiSeq asciende a 19.163.665. En la tabla 6.2 se detallan los resultados correspondientes a cada una de las muestras. Una vez depuradas las secuencias de baja calidad y eliminadas las 310.593 secuencias pertenecientes al Dominio Archaea y las 24.398 no clasificadas, las secuencias utilizadas en los análisis fueron 12.182.362. Se definieron OTUs teniendo en cuenta un 3% de diferencia máxima entre las secuencias que los integraban, generándose así 60.040 OTUs, siendo las muestras con menor y mayor número de OTUS la BCST3 (6.293) y BHRN2 (12.724) respectivamente. Se obtuvo una cobertura superior al 99% en todas las muestras, y unos índices de diversidad elevados, por ejemplo, los índices de Shannon oscilan entre 6,779 y 7,652 (tabla 6.2). Una vez realizados los test estadísticos para determinar las diferencias significativas entre los índices de diversidad según procedencia del suelo, la variedad de tomatara o la presencia o ausencia de inóculo ($p < 0,05$), se observó que solo hay diferencias significativas al comparar todas las muestras del suelo de la parcela Hidalgo con las del suelo de la parcela Castellà. Como en los ensayos realizados en los capítulos anteriores, para el estudio de la β -diversidad se utilizó el mismo número de secuencias

para cada réplica, que se ajustaría con el de la muestra con menos secuencias obtenidas, y que es de 270.672. Como puede observarse en la figura S6.1 que las curvas de rarefacción llegan a la saturación, incluso cuando se realiza a partir de los subgrupos con 270.672 lecturas.

El 83,04% de las secuencias se han podido afiliar a 24 filos (Tabla 6.3), y un 16,96% no ha podido afiliarse a ningún grupo bacteriano conocido. Los filos dominantes (>1%) son Proteobacteria (34,19%), Bacteroidetes (14,90%), Actinobacteria (11,49%), Firmicutes (7,84%), Acidobacteria (7,47%), Verrucomicrobia (3,05%), Gemmatimonadetes (1,19%) y Planctomycetes (1,15%). Cuando se comparan las muestras correspondientes al tratamiento con *Trichoderma asperellum*, respecto a las no tratadas con el agente de control biológico se observa que los filos Bacteroidetes y Chlamydiae son más abundantes en las macetas sin inocular, siendo estas diferencias significativas ($p < 0,05$) (tabla 6.3). En cuanto a la comparación de las muestras sembradas con diferentes variedades de tomate, solamente un filo presenta diferencias significativas: Verrucomicrobia, el cual es más abundante en el caso de Durinta, la variedad susceptible al patógeno. Finalmente, el mayor porcentaje de diferencias significativas se obtuvo al comparar muestras de macetas con suelos de distinta procedencia. Los filos más abundantes en el suelo de la parcela *Castellà* son, Actinobacteria y Firmicutes; mientras que los correspondientes a la parcela *Hidalgo* son Chloroflexi, Armatimonadetes, Chlamydiae, Parcubacteria (OD1), Deinococcus-Thermus, Saccharibacteria (TM7), Spirochaetes y Microgenomates (OP11).

Cuando se analizan estas secuencias a nivel de género o la afiliación filogenética más específica que se ha conseguido identificar, teniendo en cuenta solamente los taxones dominantes (>1%), se obtienen 22 categorías taxonómicas pertenecientes a 7 filos (Tabla 6.4). Al filo Proteobacteria pertenecen *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Steroidobacter*, así como diferentes familias y órdenes sin llegar a género. Respecto a las Acidobacteria, se han detectado tres subgrupos, *GP6*, *GP4* y *GP3*. Bacteroidetes es un filo donde se han identificado dos géneros *Ohtaekwangia* y *Pontibacter*, además de otros taxones superiores. *Gemmatimonas* es el único género presente del filo Gemmatimonadetes. De los otros 3 filos, Actinobacteria, Verrucomicrobia y Firmicutes,

no hay ningún género identificado entre los taxones con más de un uno por ciento de abundancia.

Se han realizado test t de student para determinar si hay diferencias significativas ($p < 0,05$) a nivel de composición taxonómica entre las diferentes variables objeto de estudio. Estas comparaciones se han realizado a partir del nivel taxonómico más específico. Si comparamos las secuencias correspondientes a las muestras inoculadas con *Trichoderma asperellum* y las que no lo han sido, únicamente encontramos diferencias significativas entre las secuencias pertenecientes a la familia Chitinophagaceae sin clasificar, estando más representadas no inoculadas (tabla 6.4). Cuando comparamos las secuencias según la variedad de tomate cultivada, observamos que las secuencias significativamente más abundantes en la variedad resistente (Monika) pertenecen al género *Sphingomonas* y al orden Rhizobiales, ambos pertenecientes al filo Proteobacteria, al contrario; por el contrario, en la variedad susceptible (Durinta) los taxones más representativos son miembros *incertae sedis* del filo Verrucomicrobia. Al igual que en el estudio a nivel de filo, cuando se comparan las muestras pertenecientes a los dos suelos por separado es donde se observan más diferencias. Las secuencias que son significativamente más abundantes en las muestras que proceden del suelo de la parcela *Hidalgo* pertenecen a los siguientes táxones: el orden Myxococcales y las clases Gammaproteobacteria y Betaproteobacteria, pertenecientes al filo Proteobacteria y a Bacteroidetes sin identificar. En el caso de la parcela *Castellà* estas pertenecen a los siguientes grupos taxonómicos: Bacillales sin clasificar del filo Firmicutes, el subgrupo GP3 del filo Actinobacterias, y por último los géneros *Pontibacter*, *Sphingomonas*, *Steroidobacter* del filo Proteobacteria, así como secuencias de Alphaproteobacteria sin clasificar.

Tabla 6.2 Número de lecturas iniciales y procesadas de Illumina MiSeq, número de OTUs e índices de diversidad correspondientes a la comunidad bacteriana de las diferentes muestras analizadas.

Muestra [^]	Lecturas iniciales	Lecturas procesadas	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
BC1	807.704	498.075	10.899	0,994	7,09	14.423,78
BCRN1	817.172	471.085	10.968	0,994	7,30	15.309,03
BCRN2	776.004	464.232	10.009	0,995	7,28	13.414,67
BCRN3	948.641	572.042	9.498	0,996	7,21	13.454,76
BCRT1	785.953	489.642	10.829	0,994	6,93	14.159,44
BCRT2	706.094	397.286	8.615	0,994	7,16	11.947,32
BCRT3	432.842	270.672	9.680	0,991	7,25	12.249,24
BCSN1	758.911	450.651	8.023	0,995	6,78	11.515,53
BCSN2	814.360	464.399	9.535	0,994	7,27	14.746,59
BCSN3	806.284	512.127	9.360	0,995	7,23	12.960,85
BCST1	699.026	381.199	9.196	0,994	7,10	11.945,05
BCST2	828.537	528.667	8.020	0,996	7,23	11.862,04
BCST3	491.588	293.495	6.293	0,995	7,18	8.690,13
BH1	533.742	331.015	9.806	0,992	6,84	12.603,91
BHRN1	978.116	633.875	11.136	0,995	7,51	15.742,07
BHRN2	556.023	305.568	10.778	0,990	7,65	15.225,51
BHRN3	983.751	617.480	12.724	0,995	7,51	17.516,11
BHRT1	665.670	448.576	10.358	0,995	7,39	13.425,56
BHRT2	850.348	561.179	11.719	0,995	7,52	15.782,65
BHRT3	495.015	348.339	8.035	0,994	7,38	11.186,18
BHSN1	801.898	583.702	12.042	0,994	7,58	17.080,08
BHSN2	753.988	553.321	11.301	0,995	7,35	15.783,40
BHSN3	868.585	617.426	11.624	0,995	7,41	16.929,64
BHST1	721.438	470.622	11.644	0,99	7,21	15.471,57
BHST2	761.875	539.306	12.208	0,99	7,58	17.027,53
BHST3	520.100	378.381	8.894	0,99	7,44	12.122,02

[^]Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al bacterioma (B); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderma asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

Tabla 6.3 Número de secuencias totales pertenecientes a cada uno de los 24 filos bacterianos detectados, y como se distribuyen en las diferentes muestras analizadas. Diferencias significativas determinadas mediante t de student ($p < 0,05$).

Filo	Total	BC1 [^]	BCRN1 [^]	BCRN2 [^]	BCRN3 [^]	BCRT1 [^]	BCRT2 [^]	BCRT3 [^]	BCSN1 [^]	BCSN2 [^]	BCSN3 [^]	BCST1 [^]	BCST2 [^]	BCST3 [^]
Proteobacteria	4164841	133887	157894	156301	195067	201125	132632	91903	169916	145245	159461	106523	171490	84436
Bacteria sin clasificar***	2065666	67063	68832	68672	82031	62077	59963	42321	64185	68115	76871	61693	93964	53948
Bacteroidetes*	1815034	82545	77966	81716	110063	62741	45194	38382	81814	57134	90229	37972	66245	39648
Actinobacteria***	1399507	102890	44945	45168	61451	53083	54971	33178	42176	74712	66334	48754	78956	34704
Firmicutes***	955470	55120	45688	37445	52925	50304	49038	20180	24591	53927	36452	70984	38323	24021
Acidobacteria	910253	30706	41850	41359	35744	34221	32624	26730	31555	31664	39963	30933	37340	31278
Verrucomicrobia**	371208	8697	15970	15775	14444	9931	8085	6000	17960	16117	22995	10453	19745	11538
Gemmatimonadetes	144557	4593	6263	6677	7157	4339	4510	4077	5622	3870	5819	3168	7400	4028
Planctomycetes	140635	6437	5594	4727	4985	5282	4593	3517	5509	6651	6562	5005	6338	4565
Chloroflexi***	71512	3175	1771	1813	2720	2047	2013	1351	2211	2582	2439	1887	2744	1735
Nitrospira	55811	1595	2031	2197	2080	2643	2385	1516	1604	2209	2302	2156	2932	2216
Armatimonadetes***	46186	496	1263	1191	1949	813	515	750	2082	1213	1686	712	1940	617
Chlamydiae*/***	14619	404	348	533	547	484	353	326	511	428	495	418	204	340
Parcubacteria (OD1)***	11974	81	289	274	458	106	53	152	551	138	79	196	453	248
Deinococcus-Thermus***	6506	148	99	169	183	155	158	68	110	109	130	77	172	37
Saccharibacteria (TM7)***	4078	65	87	55	106	117	100	27	146	114	83	131	311	106
Sumerlaeota (BRC1)	2353	35	186	143	89	148	90	141	105	118	157	40	94	0
Latescibacteria (WS3)	837	68	2	7	33	13	9	53	3	53	51	67	0	30
Spirochaetes***	596	0	0	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microgenomates (OP11)***	464	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0
Aquificae	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0
Tenericutes	88	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorobi	45	5	0	0	0	13	0	0	0	0	19	0	0	0
Absconditabacteria (SR1)	19	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusobacteria	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Filo	Total	BH1 [^]	BHRN1 [^]	BHRN2 [^]	BHRN3 [^]	BHRT1 [^]	BHRT2 [^]	BHRT3 [^]	BHSN1 [^]	BHSN2 [^]	BHSN3 [^]	BHST1 [^]	BHST2 [^]	BHST3 [^]
Proteobacteria	4164841	100899	229999	100108	205026	165627	188386	115559	190087	211742	235145	187936	194919	133528
Bacteria sin clasificar***	2065666	38081	124767	59422	104045	81519	104434	61486	123039	97576	121507	82963	118555	78537
Bacteroidetes*	1815034	63526	68744	37761	108936	74845	80090	42072	75149	93928	96866	85402	71801	44265
Actinobacteria***	1399507	63742	74389	38564	51949	38781	62667	44155	63723	42577	54948	31482	51217	39991
Firmicutes***	955470	33291	47548	26994	28100	15605	42406	44081	45762	18992	24693	14249	24595	30156
Acidobacteria	910253	15327	43503	20238	65096	39825	43098	19183	41225	44929	40426	30623	35896	24917
Verrucomicrobia**	371208	6262	17033	8682	23476	13361	15510	8751	16780	20332	16205	19526	17216	10364
Gemmatimonadetes	144557	1952	8814	3190	8147	5594	6437	3401	7677	6239	8243	5576	6846	4918
Planctomycetes	140635	3856	5931	3266	7073	5510	6783	3889	6631	6514	6099	4582	6126	4610
Chloroflexi***	71512	2251	4358	2686	4870	2242	3474	2478	4964	2840	4227	2581	3578	2475
Nitrospira	55811	881	3212	1302	3931	2220	1955	920	2610	2978	2042	2089	2398	1407
Armatimonadetes***	46186	317	3342	1825	3868	1528	3045	676	3071	2374	3563	2139	3736	1475
Chlamydiae*/***	14619	235	850	623	1052	388	467	263	1483	952	1403	352	682	478
Parcubacteria (OD1)***	11974	25	633	470	1020	848	885	357	965	690	1009	528	775	691
Deinococcus-Thermus***	6506	212	404	148	266	232	1021	697	259	253	593	237	348	221
Saccharibacteria (TM7)***	4078	58	167	188	227	202	370	252	196	146	363	101	226	134
Sumerlaeota (BRC1)	2353	41	61	50	146	157	62	12	15	186	43	79	115	40
Latescibacteria (WS3)	837	23	45	11	140	13	20	45	29	21	11	27	16	47
Spirochaetes***	596	9	36	10	84	60	1	20	23	14	16	50	191	70
Microgenomates (OP11)***	464	27	39	19	28	19	68	19	14	38	24	33	62	57
Aquificae	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	0	0
Tenericutes	88	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0
Chlorobi	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
Absconditabacteria (SR1)	19	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusobacteria	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Filos con diferencias significativas entre las muestras que tienen inóculo de *Trichoderma* y las que no.

**Filo con diferencias significativas entre las muestras con diferentes variedades de tomatara.

***Filos con diferencias significativas entre las macetas con suelo de la parcela *Hidalgo* y las de *Castellà*.

[^]Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al bacterioma (B); la segunda, la procedencia del suelo, C: Castellà o H: Hidalgo; la tercera, la variedad de tomatara, R: resistente (Monika) o S: susceptible (Durinta); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderma asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

Tabla 6.4 Porcentaje de secuencias que pertenecen a cada uno de los géneros bacterianos más abundantes (>1%), datos obtenidos mediante Illumina MiSeq. Diferencias significativas determinadas mediante t de student ($p < 0,05$).

Género ⁺	Total	BC1 [^]	BCRN1 [^]	BCRN2 [^]	BCRN3 [^]	BCRT1 [^]	BCRT2 [^]	BCRT3 [^]	BCSN1 [^]	BCSN2 [^]	BCSN3 [^]	BCST1 [^]	BCST2 [^]	BCST3 [^]
Bacteria sin clasificar***	16,96	13,46	14,61	14,79	14,34	14,24	14,67	15,01	19,68	19,45	16,85	21,08	17,63	19,68
Ohtaekwangia	3,27	3,18	3,28	3,16	2,25	3,31	3,09	4,63	2,96	3,28	4,55	3,65	3,76	3,14
Gammaproteobacteria sin clasificar***	3,05	3,54	2,36	2,93	1,97	2,07	2,47	2,58	3,12	3,11	2,90	2,88	3,56	3,31
Gp6	2,80	2,54	3,36	3,19	1,95	2,45	2,47	2,73	2,54	2,38	3,56	2,77	3,32	2,56
Betaproteobacteria sin clasificar***	2,80	1,21	1,94	2,24	1,61	1,68	1,68	1,96	3,93	3,43	2,97	4,05	3,93	3,93
Bacillales sin clasificar***	2,54	3,85	2,77	2,38	2,92	1,96	4,51	2,58	2,25	2,67	1,12	2,53	0,93	1,16
Alphaproteobacteria sin clasificar***	2,37	1,94	2,42	2,56	2,84	2,02	2,72	2,25	2,84	2,13	1,81	2,10	2,25	2,23
Proteobacteria sin clasificar***	2,22	1,15	1,74	2,10	1,64	1,46	1,78	1,84	2,79	3,04	2,93	2,63	2,71	2,47
Gp4	2,14	1,13	2,82	2,91	1,99	2,43	1,89	2,28	1,69	1,84	4,02	1,87	2,34	1,59
Actinobacteria sin clasificar***	2,12	3,81	1,77	1,90	2,08	2,10	3,31	2,74	2,19	2,12	1,46	1,93	1,39	1,46
Bacteroidetes sin clasificar***	2,06	1,15	1,56	1,70	1,51	2,18	1,23	2,28	1,82	2,18	3,01	2,42	2,85	2,35
Pontibacter***	1,72	2,42	2,61	3,47	4,02	2,07	1,41	2,02	0,86	0,68	1,33	1,24	1,05	1,30
Sphingomonas**/**	1,69	0,98	2,51	2,57	2,68	1,37	1,29	1,26	1,82	1,22	1,22	1,51	1,23	1,64
Steroidobacter***	1,67	1,69	1,82	1,64	1,18	1,41	1,93	2,09	1,81	1,45	2,15	1,52	1,49	1,11
Sphingomonadaceae sin clasificar***	1,67	1,03	2,13	2,59	3,06	1,45	1,80	1,23	1,85	1,24	1,20	1,31	1,29	1,56
3_genus_incertae_sedis**	1,54	0,99	1,56	1,61	0,99	1,89	1,87	2,64	1,45	1,30	2,04	1,44	1,85	1,41
Rhizobiales sin clasificar**	1,47	1,49	1,33	1,28	1,62	1,23	1,70	1,56	2,01	1,50	1,27	1,37	1,32	1,15
Myxococcales sin clasificar***	1,45	1,05	1,02	1,05	0,99	0,91	0,89	1,18	1,87	1,96	1,71	2,38	1,83	1,58
Pseudomonas	1,43	1,29	1,36	0,66	0,78	11,67	2,81	3,62	0,32	0,58	0,51	0,44	0,31	0,61
Actinomycetales sin clasificar***	1,33	3,55	1,05	1,14	1,35	1,04	1,81	1,45	1,12	1,31	0,76	1,18	0,84	1,08
Chitinophagaceae sin clasificar**/**	1,29	0,52	1,55	1,60	2,54	2,35	1,05	1,63	0,88	1,12	1,69	0,92	1,50	1,14
Flavobacteriaceae sin clasificar	1,24	2,47	1,25	1,66	1,42	2,33	0,85	1,27	0,57	0,98	0,74	0,60	1,37	1,55
Gemmatimonas	1,19	0,92	1,33	1,44	1,25	1,25	0,83	1,14	1,39	1,04	1,32	1,32	1,13	1,34
Gp3***	1,15	1,13	1,37	1,50	1,14	1,11	1,34	1,76	1,00	0,85	1,29	0,94	0,96	0,91
Otros	38,85	43,48	40,49	37,94	41,88	34,00	40,59	36,26	37,23	39,13	37,58	35,92	39,15	39,77

Género ⁺	Total	BH1 [^]	BHRN1 [^]	BHRN2 [^]	BHRN3 [^]	BHRT1 [^]	BHRT2 [^]	BHRT3 [^]	BHSN1 [^]	BHSN2 [^]	BHSN3 [^]	BHST1 [^]	BHST2 [^]	BHST3 [^]
Bacteria sin clasificar***	16,96	11,50	12,68	15,09	15,64	16,18	17,77	18,38	18,17	18,61	17,65	17,63	21,98	20,76
Ohtaekwangia	3,27	4,89	2,36	2,22	2,60	2,66	3,04	3,20	4,16	3,23	2,88	3,27	2,89	2,90
Gammaproteobacteria sin clasificar***	3,05	6,01	2,42	2,74	2,58	2,23	2,46	3,63	3,81	3,72	3,17	3,56	3,14	3,99
Gp6	2,80	1,73	2,62	3,37	3,73	3,33	2,51	4,61	3,22	2,77	2,07	2,46	2,65	2,54
Betaproteobacteria sin clasificar***	2,80	1,11	1,40	1,57	2,26	1,79	2,36	2,32	3,39	3,25	2,99	4,23	5,02	4,59
Bacillales sin clasificar***	2,54	2,89	3,69	4,78	2,61	6,04	2,76	3,18	0,95	2,05	3,79	0,77	1,40	2,41
Alphaproteobacteria sin clasificar***	2,37	1,51	2,81	3,51	3,22	2,50	2,99	2,33	1,90	2,22	2,38	1,72	2,17	2,56
Proteobacteria sin clasificar***	2,22	0,75	1,64	1,80	1,96	1,81	1,93	1,54	2,72	2,59	3,02	2,60	3,30	2,84
Gp4	2,14	0,96	2,10	2,20	3,05	2,42	1,61	2,76	2,96	2,29	1,32	1,97	1,64	1,60
Actinobacteria sin clasificar***	2,12	2,21	2,03	2,63	2,01	2,61	3,22	3,02	1,58	1,75	1,86	1,26	1,64	1,85
Bacteroidetes sin clasificar***	2,06	1,52	1,07	1,09	1,41	1,29	1,85	2,12	2,89	2,21	2,17	2,93	3,08	2,62
Pontibacter***	1,72	0,95	2,06	2,74	5,07	1,62	1,68	1,41	0,62	1,38	0,65	0,98	1,04	0,85
Sphingomonas**/**	1,69	0,79	2,20	2,60	2,12	1,62	2,41	1,07	1,63	1,80	1,03	1,45	1,77	1,66
Steroidobacter***	1,67	2,30	2,23	2,03	2,35	1,74	1,73	1,54	1,60	1,54	1,69	1,23	1,09	1,70
Sphingomonadaceae sin clasificar***	1,67	0,87	2,07	2,21	2,23	1,78	2,29	1,24	1,51	1,48	0,92	1,36	1,63	1,49
3_genus_incertae_sedis**	1,54	1,15	0,76	0,78	0,99	1,48	2,33	2,41	1,34	1,27	0,98	1,59	1,86	1,47
Rhizobiales sin clasificar**	1,47	1,31	1,67	2,21	2,06	1,52	1,41	1,44	1,34	1,49	1,59	1,30	1,15	1,25
Myxococcales sin clasificar***	1,45	0,55	0,93	0,85	2,17	1,01	1,24	1,18	1,71	1,61	1,73	1,66	2,39	1,68
Pseudomonas	1,43	1,76	1,27	0,41	0,15	0,70	1,65	2,15	0,84	0,58	0,67	2,07	0,44	0,44
Actinomycetales sin clasificar***	1,33	1,93	1,02	1,27	0,96	1,66	2,38	1,50	0,93	1,02	1,25	0,71	1,19	1,35
Chitinophagaceae sin clasificar**/**	1,29	0,74	1,27	0,93	1,23	0,77	1,08	1,19	1,48	1,53	0,80	1,25	1,20	0,79
Flavobacteriaceae sin clasificar	1,24	3,01	0,87	0,81	0,76	0,42	0,40	1,52	0,83	1,15	0,92	3,17	0,82	0,86
Gemmatimonas	1,19	0,59	0,89	1,14	1,51	0,83	1,40	1,37	1,25	1,15	0,98	1,18	1,27	1,30
Gp3***	1,15	0,96	1,16	1,49	1,16	1,29	1,58	1,47	1,01	1,07	0,85	0,91	0,80	0,95
Otros	38,85	48,02	46,78	39,52	36,19	40,70	35,91	33,42	38,16	38,23	42,63	38,74	34,46	35,53

*Taxón con diferencias significativas entre las muestras que tienen inóculo de *Trichoderma* y las que no.

**Taxón con diferencias significativas entre las muestras con diferentes variedades de tomatara.

***Taxón con diferencias significativas entre las macetas con suelo de la parcela *Hidalgo* y las de *Castellà*.

[^]Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al bacterioma (B); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatara, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderma asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la réplica procedimental.

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico

Micobioma

El análisis de la comunidad fúngica mediante Illumina MiSeq generó 21.542.237 de secuencias, tras el filtrado para reducir los errores de secuenciación y amplificación y eliminar las secuencias quiméricas, se dispuso de 10.486.800 secuencias (tabla 6.5) que son las que se utilizaron para el análisis de alfa y β -diversidad. Después de agrupar en OTUs las secuencias con menos de un 3% de diferencia, se generaron 2.796 OTUs. La muestra con menos OTUs tenía 156 (FCRN2) y la que tenía más es FHSN3, con 602. En todos los casos se obtuvieron coberturas superiores al 99,9% y unos índices de diversidad inferiores a los obtenidos en el análisis de la comunidad bacteriana (tabla 6.2). Los índices de Shannon oscilan entre 1,06 el más bajo (FHRT3) y 2,61 de FCRT3 el más elevado (tabla 6.5). Los test t de student ($p < 0,05$) realizados para determinar si había diferencias significativas entre número de OTUs y los índices de diversidad, muestran diferencias entre el número de OTUs y los índices de Shannon de las muestras según la procedencia del suelo, de igual modo que en el análisis de la comunidad bacteriana. Cabe señalar que el número OTUs es significativamente superior en el suelo de la parcela *Hidalgo*, mientras que los índices de Shannon son significativamente más elevados en el suelo de la parcela *Castellà*. El análisis de la comunidad fúngica muestra además diferencias significativas cuando se compara el número de OTUs y el valor del índice Chao en relación con la variedad de planta cultivada, observando cifras más elevadas en ambos tipos de suelo cuando la variedad cultivada es la susceptible. La muestra con menor número de secuencias es FCRN2 (195.686), por lo tanto, para los análisis de β -diversidad se reducirán todos los grupos a este número de secuencias. En la figura S6.2 se observa que las curvas de rarefacción para las muestras con 195.686 secuencias también llegan a la saturación.

Los filos fúngicos presentes en las muestras analizadas (tabla 6.6) son 7, y por orden decreciente de abundancia se corresponden a: Ascomycota (92,40%), Morteriellomycota (4,15%), Basidiomycota (1,98%), Olpidiomycota (1,11%), Glomeromycota (0,17%), Chytridiomycota (0,01%) y Rozellomycota (0,0015%), además de un 0,17% de secuencias de hongos no clasificadas. El análisis estadístico mediante el

test t de student ($p < 0,05$) realizado, muestra que únicamente hay diferencias significativas cuando comparamos los dos tipos de suelos, *Castellà* e *Hidalgo*. El filo Ascomycota está más representado en las muestras de la parcela *Hidalgo*, mientras que los filos Basidiomycota, Morteriellomycota y Olpidiomycota se encuentran en mayor porcentaje en las macetas correspondientes al suelo de la parcela *Castellà*.

Los géneros o nivel taxonómico más específico detallada a la que se ha podido acceder, muestra que los taxones más abundantes ($>1\%$) pertenecen a 3 filos (Tabla 6.7). Entre ellos, *Wallemia* (1,24%) es el único género presente del filo Basidiomycota. Las secuencias de la familia Morteriellaceae (3,19%) son las únicas del filo Mortierellomycota. La mayoría de géneros que se han podido identificar pertenecen al filo Ascomycota, *Trichophaeopsis* (18,3%), *Gibellulopsis* (7,66%), *Gibberella* (3,19%), *Fusarium* (2,98%), *Stachybotrys* (1,29%) y *Neocospora* (1,05%), como en los otros filos algunas secuencias solo se podían afiliar hasta el taxón familia: Microasceae (42%), Chaetomiaceae (6,52%), Nectriaceae (3,38%). El análisis estadístico realizado respecto de estos taxones muestra el mismo resultado que a nivel de filo, solo se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se compara la variable procedencia del suelo. Las secuencias pertenecientes a los géneros *Trichophaeopsis* y *Gibellulopsis*, ambas del filo Ascomycota, están en mayor porcentaje en las macetas correspondientes a suelo de la parcela *Hidalgo*. Sin embargo, hay taxones pertenecientes a 3 filos que son significativamente más abundantes en las réplicas de macetas con suelo de la parcela *Castellà*, Ascomycota, Morteriellomycota y Basidiomycota. Al filo Ascomycota pertenecen dos familias, Chaetomiaceae y Nectriaceae, y dos géneros, *Stachybotrys* y *Neocospora*. Del filo Mortierellomycota, serían los pertenecientes a la familia Morteriellaceae y del filo Basidiomycota, *Wallemia*. En la tabla 6.7 también se muestran las secuencias que pertenecen al género *Trichoderma*, y como se puede observar, la prevalencia de este microorganismo ha sido nula en algunas de las muestras y muy baja en otras.

Tabla 6.5 Número de lecturas iniciales y depuradas, de Illumina MiSeq correspondiente a la comunidad fúngica, número de OTUs e índices de diversidad de las diferentes muestras analizadas.

Muestra [^]	Lecturas iniciales	Lecturas depuradas	OTUs	Cobertura	Shannon	Chao
FC1	781.190	311.669	328	0,9993	2,40	2.032,23
FCRN1	657.155	246.119	194	0,9995	2,37	695,50
FCRN2	514.298	195.686	156	0,9996	2,40	634,50
FCRN3	893.159	349.974	224	0,9996	2,29	1.449,11
FCRT1	1.036.826	408.825	341	0,9995	2,59	1.563,11
FCRT2	832.103	271.376	241	0,9994	2,53	925,00
FCRT3	917.452	299.528	236	0,9995	2,61	808,35
FCSN1	791.435	274.186	230	0,9994	2,09	1.498,75
FCSN2	657.223	232.295	253	0,9992	2,47	1.108,56
FCSN3	1.211.446	407.567	300	0,9994	2,71	2.842,50
FCST1	749.959	278.771	169	0,9997	2,16	1.081,00
FCST2	1.074.662	409.619	206	0,9997	1,84	786,59
FCST3	918.986	337.476	353	0,9992	2,49	1.285,57
FH1	709.552	284.457	270	0,9995	1,93	804,37
FHRN1	916.158	356.215	315	0,9993	1,30	1.891,24
FHRN2	633.003	228.891	223	0,9994	1,73	1.059,77
FHRN3	846.898	329.538	246	0,9995	1,59	1.091,63
FHRT1	843.494	307.579	252	0,9994	1,52	1.107,56
FHRT2	914.232	334.445	256	0,9995	1,61	924,45
FHRT3	773.999	654.145	247	0,9997	1,06	972,00
FHSN1	959.780	790.720	459	0,9996	1,61	2.529,93
FHSN2	524.154	419.863	452	0,9991	1,29	2.482,63
FHSN3	901.957	730.666	602	0,9994	1,92	3.267,32
FHST1	708.663	589.681	321	0,9996	1,21	2.022,18
FHST2	880.741	707.049	401	0,9996	1,45	2.764,90
FHST3	893.712	730.460	254	0,9997	1,56	1.489,20

[^]Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al microbioma (F); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderma asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

Tabla 6.6 Porcentaje de secuencias pertenecientes a cada uno de los filos fúngicos presentes en las muestras analizadas mediante Illumina MiSeq. Diferencias significativas determinadas mediante t de student ($p < 0,05$).

Filo	FC1 [^]	FCRN1 [^]	FCRN2 [^]	FCRN3 [^]	FCRT1 [^]	FCRT2 [^]	FCRT3 [^]	FCSN1 [^]	FCSN2 [^]	FCSN3 [^]	FCST1 [^]	FCST2 [^]	FCST3 [^]
Hongos sin clasificar	0,19	0,36	0,45	0,15	0,22	0,66	0,33	0,71	0,10	0,65	0,12	0,20	0,42
Ascomycota***	80,32	89,92	88,57	90,21	87,01	80,56	90,57	85,92	86,26	77,75	89,42	91,76	76,66
Basidiomycota***	6,38	0,74	5,53	4,00	6,86	10,28	1,95	0,40	1,61	10,30	4,31	0,46	1,65
Chytridiomycota	0,14	0,00	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00
Glomeromycota	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	3,10	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00
Mortierellomycota***	11,35	6,71	4,75	4,44	4,09	7,78	6,67	5,84	4,37	10,69	5,65	4,88	9,20
Olpidiomycota***	1,61	2,26	0,66	1,10	1,82	0,71	0,48	4,03	6,73	0,61	0,47	2,68	12,06
Rozellomycota	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Filo	FH1 [^]	FHRN1 [^]	FHRN2 [^]	FHRN3 [^]	FHRT1 [^]	FHRT2 [^]	FHRT3 [^]	FHSN1 [^]	FHSN2 [^]	FHSN3 [^]	FHST1 [^]	FHST2 [^]	FHST3 [^]
Hongos sin clasificar	0,06	0,01	0,06	0,04	0,07	0,14	0,00	0,11	0,00	0,05	0,02	0,06	0,13
Ascomycota***	93,98	96,40	96,35	98,31	96,62	96,73	98,24	97,21	96,75	94,98	96,79	96,15	97,08
Basidiomycota***	0,18	0,23	0,38	0,00	0,25	0,67	0,26	0,30	0,13	3,00	0,01	0,00	0,24
Chytridiomycota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Glomeromycota	0,00	0,13	0,25	0,00	0,00	0,34	0,00	0,31	0,11	0,04	0,15	0,08	0,00
Mortierellomycota***	5,32	3,16	2,88	1,62	2,05	2,07	1,48	1,90	3,01	1,93	3,02	3,54	2,53
Olpidiomycota***	0,45	0,08	0,08	0,00	0,91	0,05	0,00	0,18	0,00	0,00	0,02	0,18	0,02
Rozellomycota	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Taxón con diferencias significativas entre las muestras que se inocularon con *Trichoderma* y las que no.

**Taxón con diferencias significativas entre las muestras correspondientes a diferentes variedades de tomatera.

***Taxón con diferencias significativas entre las muestras pertenecientes suelo de la parcela Hidalgo respecto de las de Castellà.

[^]Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al micobioma (F); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderma asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

Tabla 6.7 Porcentaje de secuencias pertenecientes a cada uno de los géneros fúngicos presentes en las muestras mediante Illumina MiSeq. Diferencias significativas determinadas mediante t de student ($p < 0,05$).

Género ⁺	FC1 [^]	FCRN1 [^]	FCRN2 [^]	FCRN3 [^]	FCRT1 [^]	FCRT2 [^]	FCRT3 [^]	FCSN1 [^]	FCSN2 [^]	FCSN3 [^]	FCST1 [^]	FCST2 [^]	FCST3 [^]
Microascaceae sin clasificar	37,59	34,77	29,78	34,55	33,18	28,45	27,19	45,06	33,19	29,06	40,42	48,38	21,17
Trichophaeopsis***	12,82	0,83	1,61	1,92	1,89	1,81	10,13	2,88	1,75	4,54	2,11	2,82	6,66
Gibellulopsis***	0,57	0,56	2,13	2,24	4,80	1,50	0,92	0,69	1,71	4,97	1,69	0,00	1,44
Chaetomiaceae sin clasificar***	3,87	23,89	27,37	28,28	23,74	23,33	25,70	22,70	22,53	15,70	0,17	0,03	0,03
Nectriaceae sin clasificar***	7,50	6,35	4,75	4,72	2,29	2,43	3,97	0,86	6,94	5,35	15,93	13,06	12,73
Gibberella	4,16	4,77	3,33	4,91	2,40	1,75	1,83	1,84	2,09	1,45	9,26	8,00	10,09
Mortierellaceae sin clasificar***	9,04	4,35	3,26	3,90	2,33	5,54	4,23	4,89	2,74	7,43	3,66	4,64	7,68
Fusarium	1,81	1,35	3,03	1,61	2,62	3,39	0,15	1,20	2,18	0,58	8,98	10,21	10,23
Stachybotrys***	3,58	5,21	6,43	1,96	2,34	4,06	4,75	3,20	4,24	0,01	3,25	2,79	2,17
Walleimia***	6,21	0,73	5,53	4,00	1,63	10,28	1,60	0,40	1,61	6,21	2,52	0,46	1,65
Neocosmospora***	2,37	4,43	1,48	2,86	2,44	2,19	2,48	1,13	1,92	1,98	0,28	0,64	0,59
Otros	10,49	12,76	11,29	9,05	20,34	15,26	17,06	15,14	19,11	22,73	11,72	8,97	25,55
Trichoderma	0,00	0,00	0,06	0,05	0,40	0,08	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,09

Género ⁺	FH1 [^]	FHRN1 [^]	FHRN2 [^]	FHRN3 [^]	FHRT1 [^]	FHRT2 [^]	FHRT3 [^]	FHSN1 [^]	FHSN2 [^]	FHSN3 [^]	FHST1 [^]	FHST2 [^]	FHST3 [^]
Microasceae sin clasificar	47,39	58,07	18,68	39,57	42,23	47,34	72,91	40,31	17,76	29,68	64,35	53,14	52,84
Trichophaeopsis***	17,57	29,24	34,11	36,94	35,82	26,00	7,69	34,86	63,71	34,97	20,41	18,33	14,73
Gibellulopsis***	6,54	2,52	30,52	6,53	11,06	11,14	11,26	7,89	9,56	10,47	7,37	16,73	16,65
Chaetomiaceae sin clasificar***	13,03	0,73	0,01	0,04	0,08	0,05	0,13	0,02	0,01	0,03	0,11	0,04	0,19
Nectriaceae sin clasificar***	0,22	0,02	2,19	1,18	1,74	0,27	0,08	5,95	1,06	0,91	0,55	0,28	0,11
Gibberella	0,84	1,03	2,12	5,65	0,97	3,17	1,61	2,88	0,61	7,66	0,75	3,98	1,11
Mortierellaceae sin clasificar***	5,07	2,79	2,04	1,41	1,64	1,48	1,23	1,52	2,24	1,12	2,52	3,17	2,05
Fusarium	0,28	0,53	5,78	4,88	0,90	4,25	0,71	1,79	0,91	3,83	1,04	0,50	6,81
Stachybotrys***	0,26	0,00	0,10	0,23	0,12	0,11	0,05	0,13	0,11	0,47	0,05	0,09	0,18
Wallemia***	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Neocosmospora***	0,86	0,91	0,31	0,27	0,20	0,79	0,42	0,50	0,11	0,30	0,30	0,87	0,86
Otros	7,93	4,16	4,14	3,31	5,24	5,40	3,92	4,14	3,91	10,57	2,56	2,86	4,46
Trichoderma	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Taxón con diferencias significativas entre las muestras que se inocularon con *Trichoderma* y las que no.

**Taxón con diferencias significativas entre las muestras correspondientes a diferentes variedades de tomatera.

***Taxón con diferencias significativas entre las muestras pertenecientes suelo de la parcela Hidalgo respecto de las de Castellà.

[^]Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al micobioma (F); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderma asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico

6.1.2 Análisis de la β -diversidad del microbioma rizosférico de las diferentes condiciones ensayadas

En este apartado se han realizado análisis estadísticos con el objetivo de poner de manifiesto diferencias entre los microbiomas rizosféricos dependiendo del tipo de suelo, la variedad de tomatera sembrada y si se ha inoculado *Trichoderma asperellum* como agente de biocontrol o no, del ensayo en maceta.

Bacterioma

La elaboración de dendrogramas con los datos correspondientes a la composición de la comunidad bacteriana a partir del análisis *Cluster* permitió determinar si estas se agrupaban según el tipo de suelo, la variedad de planta cultivada o la presencia de agente de control biológico. Como se puede observar en la figura 6.2 las muestras no se agrupan según las variables analizadas, poniendo de manifiesto una gran heterogeneidad entre las diferentes muestras, inclusive entre las diferentes réplicas de una misma muestra. Los análisis mediante Amova, solo revelan diferencias significativas en el caso de la muestra BCST con respecto al resto de muestras. En cuanto a los análisis mediante homova, se observan diferencias significativas entre las muestras iniciales, comparadas con el resto. Así pues, tanto los análisis de *cluster*, como mediante Amova y Homova ponen de manifiesto que no se pueden establecer diferencias entre las comunidades bacterianas con respecto a las tres variables analizadas (procedencia del suelo, variedad vegetal sembrada y presencia/ausencia de inóculo del agente de biocontrol).

Con el objetivo de determinar que taxones eran los más representativos en cada tipo de suelo, cada variedad de tomatera y según la presencia o no de agente de control biológico se aplicó la herramienta LEfSe. En la figura 6.3 se muestran los resultados obtenidos en este análisis. Cuando comparamos las muestras según la variedad de tomatera sembrada se puede observar secuencias representativas pertenecientes a 9 filos, y 12 cuando la comparación se corresponde a la procedencia del suelo. Los filos Proteobacteria y Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Firmicutes,

Bacteroidetes, Actinobacteria y Acidobacteria son biomarcadores de ambos tipos de suelo supresivo. No obstante, los dos primeros están más representados en las macetas con suelo perteneciente a la parcela *Hidalgo*; mientras que, los seis últimos son más abundantes del suelo de la parcela *Castellà*. Además, Deinococcus-Thermus y Chloroflexi solo aparecen como representativos en suelo de parcela *Hidalgo*, mientras que no hay ningún filo que sea representativo únicamente del suelo de la parcela *Castellà*.

En la comparación del bacterioma de ambas variedades de tomatera, la susceptible y la resistente a *Meloidogyne incognita*, es importante incluir también las muestras iniciales, previas a la sembra (BH1 y BC1). En las muestras BH1 y BC1 se han detectado dos filos (Actinobacteria y Firmicutes) que son representativos de las mismas, mientras que una vez sembradas las tomatas no lo son, además de ser las que más secuencias de Bacteroidetes representativas poseen. Se han detectado secuencias de dos filos (Planctomycetes y Armatimonadetes) biomarcadores únicamente de la variedad Durinta (susceptible), asimismo el filo Verrucomicrobia está más representado en las muestras correspondientes a esta variedad. Cabe resaltar también, que el filo Bacteroidetes está más representado en esta variedad que en la resistente. Finalmente, se han encontrado dos filos (Acidobacteria y Gemmatimonadetes) que son biomarcadores exclusivamente de la variedad resistente, Monika, además el filo Proteobacteria aun siendo biomarcador de los tres supuestos, es más abundante en las muestras de la variedad resistente a *Meloidogyne incognita*.

En cuanto a la comparación correspondiente a la presencia o ausencia del agente de biocontrol, se ha de resaltar que no hay OTUs representativos en ninguno de los casos, según LEfSe.

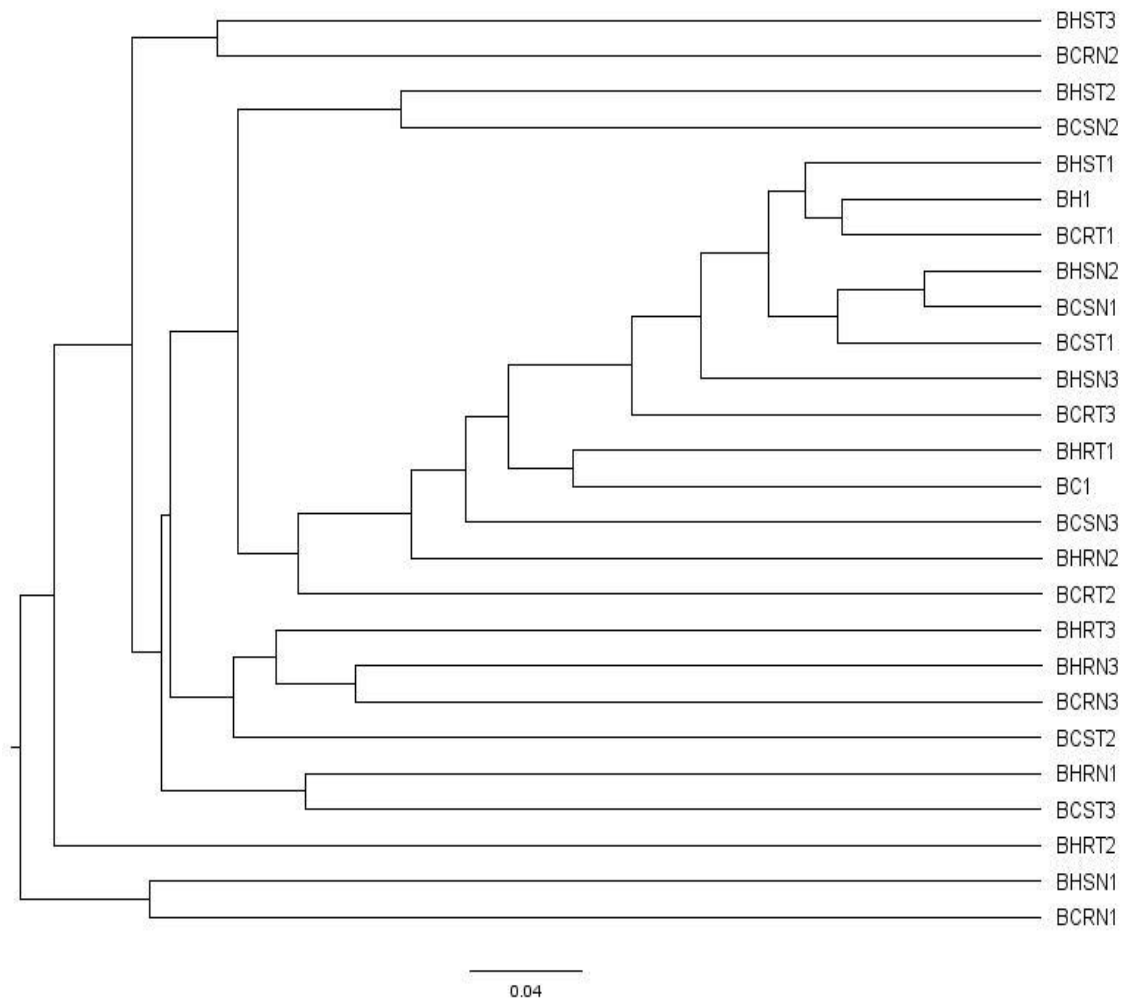


Figura 6.2 Dendrogramas con las muestras agrupadas usando el algoritmo UPGMA en base a la matriz de similitud que fue calculada con el coeficiente thetayc. Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al microbioma (B); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderm asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

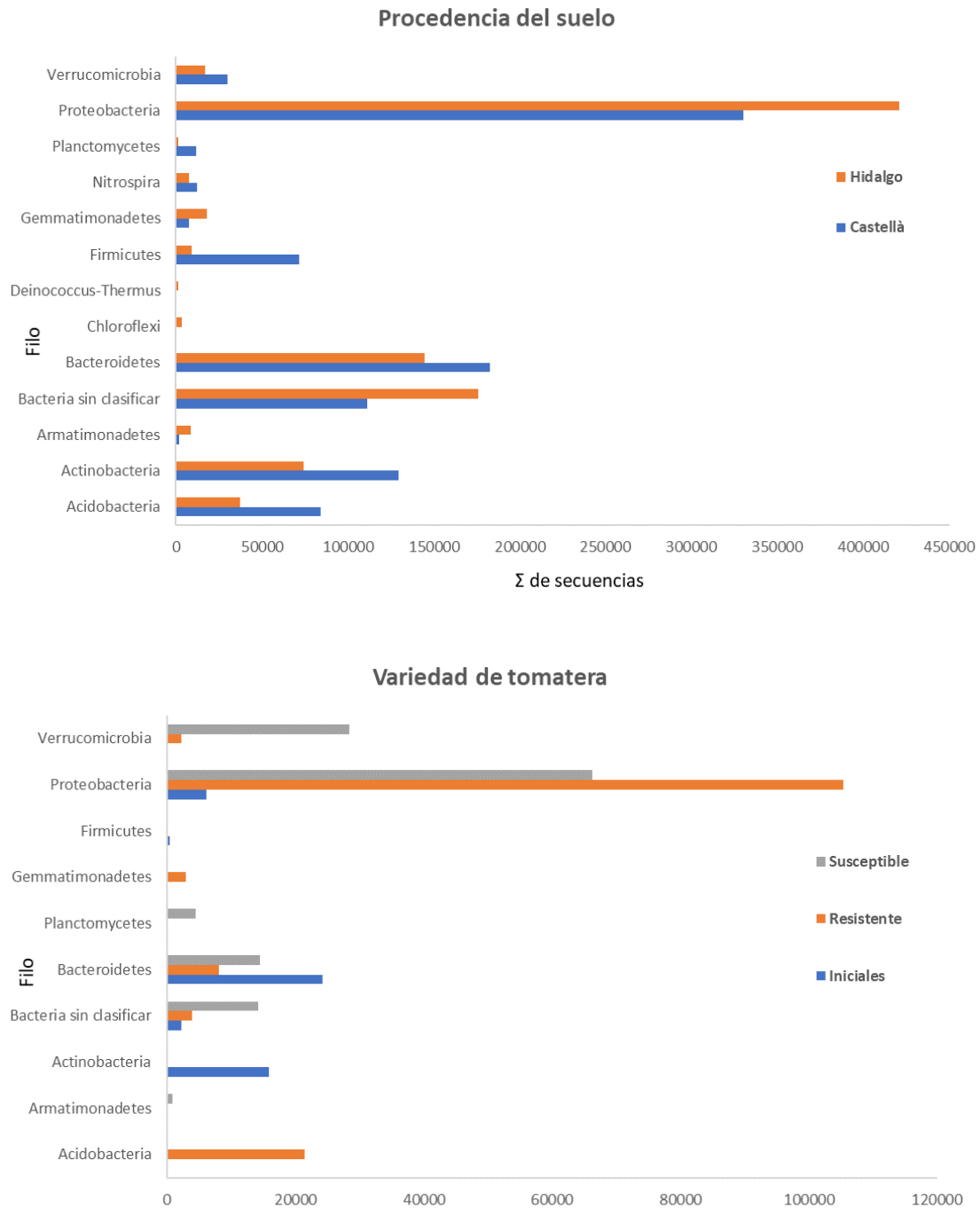


Figura 6.3 Filos bacterianos representativos para cada uno de los supuestos comparados (variedad tomatera y procedencia del suelo) y sumatorio del número de secuencias de los OTUs para cada uno de ellos, según el método LEfSe.

En las tablas S5.1 y S5.2 se muestra el número secuencias de los OTUs representativos según el algoritmo LEfSe para cada una de las variables analizadas, así como la

afiliación filogenética más precisa obtenida. En resumen, se han obtenido 155 afiliaciones taxonómicas diferentes, 146 cuando se comparan las macetas con diferentes tipos de suelo y 40 cuando se comparan las variedades de la tomatera cultivada. En la tabla 6.8 solo se detallan los géneros que tenían más de un 90% de diferencia entre el número de secuencias representativas de las variables comparadas (variedad de tomatera y tipo de suelo). La herramienta LEfSe no mostró taxones representativos cuando se comparan las muestras con y sin inóculo de *Trichoderma asperellum*.

La herramienta Microbiome para R (apartado 3.4.6) nos permitió establecer el *core* para cada variable analizada. El *core* global del ensayo está constituido por 8 filos (Tabla 6.9): Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria y Verrucomicrobia, además de un numeroso OTU de bacterias sin clasificar. Los 8 filos tienen algún representante en alguno de los *cores* perteneciente a cada una de las variables estudiadas.

En cuanto a la afiliación filogenética a nivel de género, hay representantes de cuatro filos que están presentes en todos los *cores*: géneros de las subdivisiones *GP3*, *Gp4* y *GP5* del filo Acidobacteria, *Ohtaekwangia* y *Pontibacter* del filo Bacteroidetes, *Gemmatimonas* perteneciente a las Gemmatimonadetes y *Sphingomonas* y *Steroidobacter* del filo Proteobacteria. Además, hay géneros que aparecen solo en los *cores* de algunas de las variables estudiadas: *Adhaeribacter* (Bacteroidetes) forma parte del *core* de las muestras de la variedad Durinta y de las muestras sin tratamiento con el agente de control biológico. Secuencias de *Sporosarcina* (Firmicutes) aparecen en los *cores* de la variedad *Monika*, en las muestras con tratamiento de *Trichoderma* y en las muestras de la parcela *Castellà*. Por último, *Opitutus* (Verrucomicrobia) está presente en los *cores* de la variedad *Durinta* y suelos de la parcela *Hidalgo*.

Tabla 6.8 Géneros bacterianos representativos que presentan una diferencia en el número de secuencias mayor a un 90% al comparar los diferentes supuestos (variedad tomatera y procedencia del suelo) mediante LEfSe. a) *Hidalgo*, b) *Castellà*, c) *Durinta*, d) *Monika*, e) iniciales.

a)	Filo	Género	b)	Filo	Género
	Acidobacteria	Género de la subdivisión Gp10 Género de la subdivisión Gp16		Acidobacteria	Género de la subdivisión Gp9 <i>Phycoccus</i>
	Actinobacteria	<i>Rubrobacter</i> <i>Promicromonospora</i> <i>Blastococcus</i> <i>Nocardioides</i> <i>Glycomyces</i> <i>Actinophytocola</i> <i>Planobispora</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Aciditerrimonas</i>			<i>Jiangella</i> <i>Aeromicrobium</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Streptomyces</i> <i>Solirubrobacter</i>
	Bacteroidetes	<i>Terrimonas</i> <i>Algoriphagus</i> <i>Salisaeta</i> <i>Salegentibacter</i> <i>Chitinophaga</i> <i>Salinimicrobium</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Ohtaekwangia</i>		Bacteroidetes	<i>Fluviicola</i> <i>Rhodocytophaga</i> <i>Emticicia</i> <i>Flavisolibacter</i> <i>Pedobacter</i> <i>Adhaeribacter</i> <i>Pontibacter</i>
	Deinococcus-Thermus	<i>Truepera</i>		Firmicutes	<i>Thermoactinomyces</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Gracilibacillus</i>
	Firmicutes	<i>Pasteuria</i>		Planctomycetes	<i>Planctomyces</i>
	Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i> <i>Halomonas</i> <i>Kofleria</i> <i>Marinobacter</i> <i>Rheinheimera</i> <i>Methylobacillus</i> <i>Methylophaga</i> <i>Geobacter</i> <i>Arenimonas</i> <i>Erythrobacter</i> <i>Duganella</i> <i>Pelagibius</i> <i>Enhygromyxa</i> <i>Rhodoplanes</i> <i>Azoarcus</i> <i>Serpens</i> <i>Salinicola</i>		Proteobacteria	<i>Geminicoccus</i> <i>Myxococcus</i> <i>Pseudoxanthomonas</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Skermanella</i> <i>Pusillimonas</i> <i>Asticcacaulis</i> <i>Ensifer</i> <i>Novosphingobium</i> <i>Phenylobacterium</i> <i>Corallococcus</i> <i>Luteimonas</i> <i>Microvirga</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Peredibacter</i> <i>Massilia</i> <i>Sphingomonas</i>
	Verrucomicrobia	<i>Haloferula</i> <i>Pelagicoccus</i>		Verrucomicrobia	<i>Prostheco bacter</i>

c)

Filo	Género
Bacteroidetes	<i>Fluviicola</i>
	<i>Flavobacterium</i>
	<i>Sediminibacterium</i>
	<i>Salisaeta</i>
Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i>
	<i>Azoarcus</i>
Verrucomicrobia	<i>Opitutus</i>
	<i>Haloferula</i>

e)

Filo	Género
Acidobacteria	Género de la subdivisión Gp10
	<i>Actinomadura</i>
	<i>Aeromicrobium</i>
Actinobacteria	<i>Kribbella</i>
	<i>Nocardioides</i>
	<i>Nocardiopsis</i>
	<i>Adhaeribacter</i>
Bacteroidetes	<i>Algoriphagus</i>
	<i>Gracilimonas</i>
	<i>Ohtaekwangia</i>
	<i>Pedobacter</i>
	<i>Oceanobacillus</i>
Firmicutes	<i>Acinetobacter</i>
	<i>Cronobacter</i>
	<i>Lysobacter</i>
	<i>Pantoea</i>
Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i>
	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Rhizobium</i>

d)

Filo	Género
Acidobacteria	Género de la subdivisión Gp4
	Género de la subdivisión Gp7
Bacteroidetes	<i>Dyadobacter</i>
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>
Proteobacteria	<i>Sphingobium</i>
	<i>Sphingomonas</i>
	<i>Methylophilus</i>
	<i>Nannocystis</i>
	<i>Cellvibrio</i>
	<i>Pseudoxanthomonas</i>

Tabla 6.9 OTUs que forman parte del *core* de la comunidad bacteriana global y para cada variable a analizar (variedad de tomatera, procedencia del suelo y tratamiento). Análisis realizado mediante la herramienta Microbiome para R (90% de prevalencia y 0,5% de presencia)

Filotipo	Tamaño	Afiliaión taxonómica		Gobal	Monika	Durinta	Inóculo de <i>Trichoderma</i>	Sin inóculo	Castellà	Hidalgo
		Filo	Género ⁺							
22	140.425	Acidobacteria	Género de la subdivisión <i>Gp3</i>							
15	261.217		Género de la subdivisión <i>Gp4</i>							
3	340.815		Género de la subdivisión <i>Gp6</i>							
8	258.419	Actinobacteria	Actinobacteria sin clasificar							
17	161.612		Actinomycetales sin clasificar							
42	78.006		Micrococcaceae sin clasificar							
40	65.331		Nocardiodaceae sin clasificar							
35	83.980		Streptomycetaceae sin clasificar							
1	2.065.666	Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar							
39	83.744	Bacteroidetes	<i>Adhaeribacter</i>							
10	250.488		Bacteroidetes sin clasificar							
20	157.019		Chitinophagaceae sin clasificar							
24	150.520		Flavobacteriaceae sin clasificar							
9	398.149		<i>Ohtaekwangia</i>							
14	209.756		<i>Pontibacter</i>							
30	75.013		Sphingobacteriales sin clasificar							
6	309.403	Firmicutes	Bacillales sin clasificar							
49	112.608		<i>Sporosarcina</i>							
73	112.608		<i>Sporosarcina</i>							

Tabla 6.9 (continuación)

Filotipo	Tamaño	Afilación taxonómica		Gobal	Monika	Durinta	Inóculo de <i>Trichoderma</i>	Sin inóculo	Castellà	Hidalgo
		Filo	Género ⁺							
21	144.557	Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>							
18	80.554	Planctomycetes	Planctomycetaceae sin clasificar							
5	288.958	Proteobacteria	Alphaproteobacteria sin clasificar							
7	340.699		Betaproteobacteria sin clasificar							
26	63.182		Deltaproteobacteria sin clasificar							
38	71.442		Erythrobacteraceae sin clasificar							
2	371.264		Gammaproteobacteria sin clasificar							
12	176.363		Myxococcales sin clasificar							
4	270.655		Proteobacteria sin clasificar							
11	179.103		Rhizobiales sin clasificar							
28	92.867		Rhodospirillales sin clasificar							
13	202.843		Sphingomonadaceae sin clasificar							
37	206.260		<i>Sphingomonas</i>							
19	203.604		<i>Steroidobacter</i>							
16	187.328		Verrucomicrobia	3 géneros incertae sedis						
27	79.303	<i>Opitutus</i>								

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

Micobioma

Cuando analizamos la similitud entre las diferentes muestras a nivel de composición taxonómica de las comunidades fúngicas también podemos observar, como en el caso de la comunidad bacteriana, una elevada heterogeneidad (Figura 6.4); no obstante, en este caso en el análisis de *Cluster* se obtiene un dendrograma donde las muestras tienden a agruparse en función del tipo de suelo (*Castellà* e *Hidalgo*). Los test Homova realizados muestran que sólo hay diferencias significativas entre muestras cuando comparamos las correspondientes al inicio del experimento (FH1 y FC1) con el resto de muestras, resultado similar al obtenido en el análisis de la comunidad bacteriana. Los test Amova no muestran diferencias significativas entre las poblaciones fúngicas cuando se comparan las variables estudiadas (procedencia del suelo, variedad de tomatera o presencia/ausencia de inóculo de *Trichoderma asperellum*).

La prueba LEfSe aplicada a las secuencias fúngicas, muestra OTUs representativos al comparar la variedad de tomatera, así como la procedencia del suelo de la maceta (parcela de origen) (Figura 6.5), pero no al comparar muestras con y sin tratamiento con el agente biocontrol (*Trichoderma asperellum*). Los filos representativos respecto de la variedad de tomatera son 3, Mortierellomycota, Chytridiomycota y Ascomycota, y 4 en el caso del tipo de suelo, Ascomycota, Mortierellomycota, Basidiomycota y Olpidiomycota. Cabe enfatizar que los tres últimos sólo se observan secuencias representativas en las muestras correspondientes a suelo de la parcela Castellà.

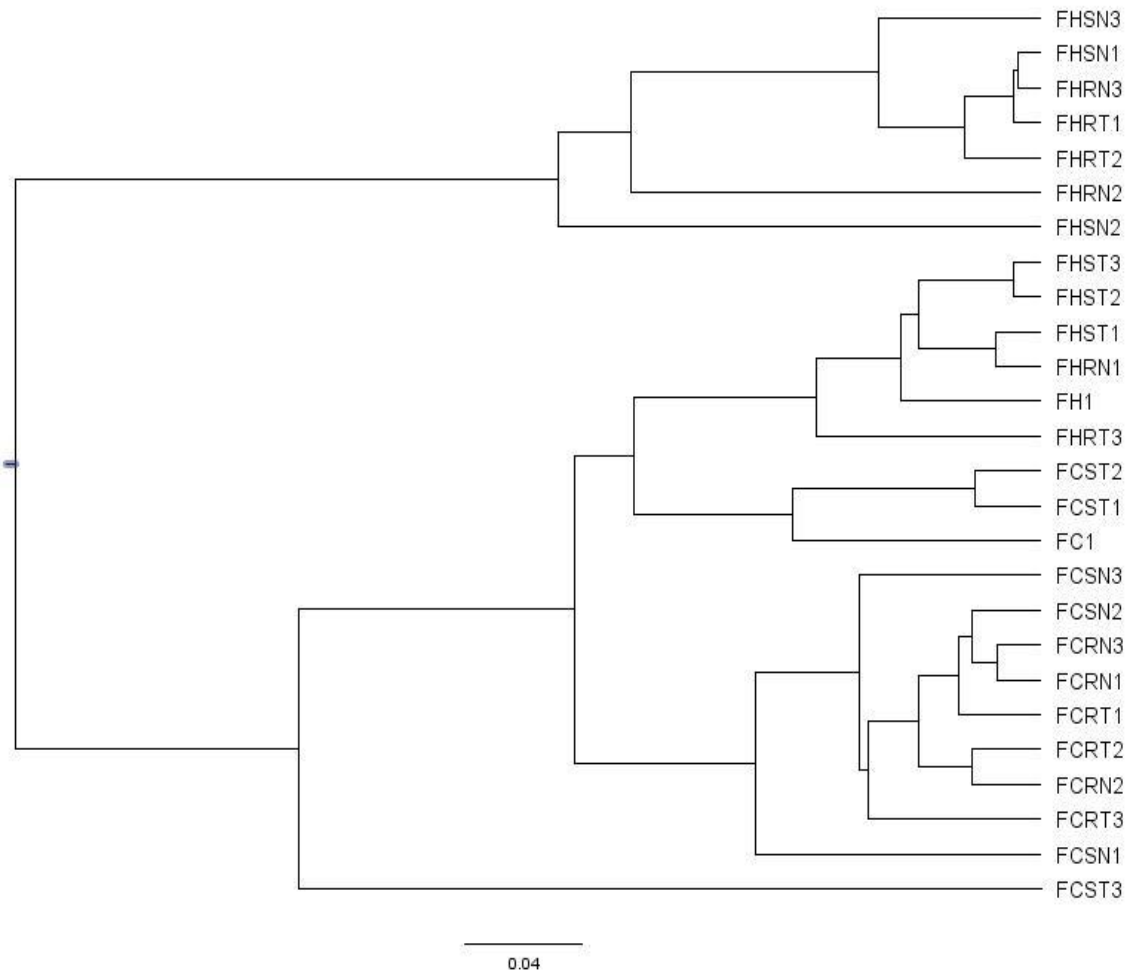


Figura 6.4 Dendrogramas con las muestras agrupadas usando el algoritmo UPGMA en base a la matriz de similitud que fue calculada con el coeficiente thetayc. Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al micobioma (F); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: inoculado con *Trichoderm asperellum*, N: Sin inocular; y el número es la replica procedimental.

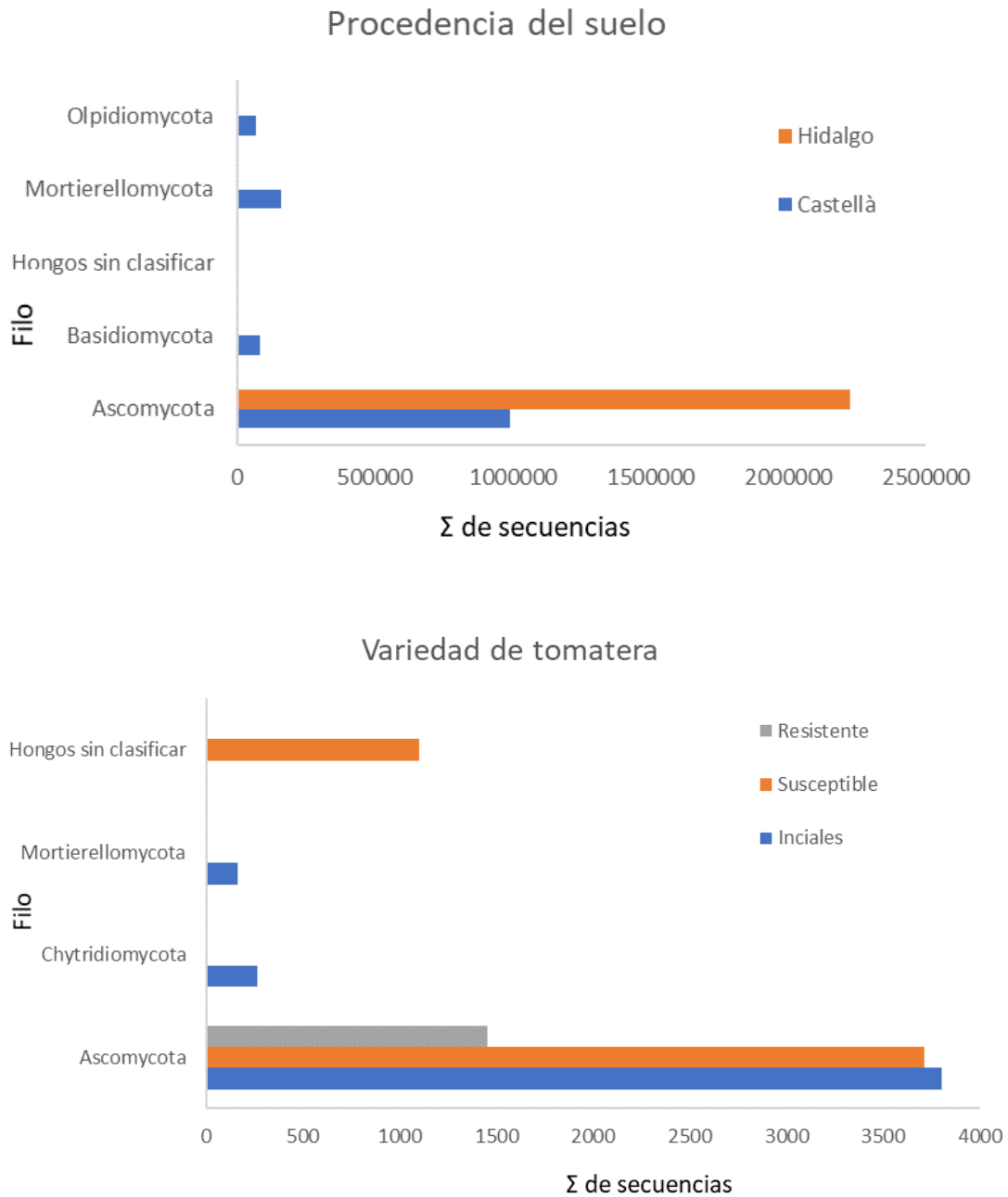


Figura 6.5 Filos fúngicos representativos para cada uno de los supuestos comparados (variedad tomatera y procedencia del suelo) y sumatorio del número de secuencias de los OTUs para cada uno de ellos, según el método LEfSe.

En la tabla 6.10 se detallan los géneros o especies asociados a los OTUs representativos según la procedencia del suelo y la variedad de tomatera.

Para realizar el estudio comparativo de la variedad de tomatera también se han tenido en cuenta las muestras iniciales. En este caso, es interesante observar que 5 especies

son representativas de las muestras iniciales: *Gymnoascus reessii*, *Acremonium chrysogenum*, *Arachniotus hebridensis*, *Cladosporium limoniforme* y *Pyrenochaeta inflorescentiae*, pero que pierden esa relevancia una vez sembradas las variedades de tomatera. Los filos Chytridiomycota y Mortierellomycota, aparecen como representativos únicamente en las muestras iniciales. A partir de la observación de la tabla 6.10a se puede inferir que la diversidad de OTUs relevantes baja drásticamente una vez son sembradas las tomateras.

El 99.98% de las secuencias representativas de las muestras correspondientes a suelos de la parcela *Hidalgo* pertenecen al filo Ascomycota, la mayor parte pertenecen a la familia Microascaceae (51,7%), y a los géneros *Trichophaeopsis* (32,9%) y *Gibellulopsis* (13,15%). En las muestras correspondientes a la parcela *Castellà* las secuencias más representativas son más diversas, siendo los taxones representativos (con una abundancia relativa superior al 1%) Chaetomiaceae sin clasificar, Nectriaceae sin clasificar, *Gibberella intricans*, *Stachybotrys chlorohalonata*, *Neocosmospora*, *Pseudogymnoascus*, *Aspergillus*, *Geomyces*, Plectosphaerellaceae sin clasificar y *Cladosporium* del filo Ascomycota; *Wallemia* del filo Basidiomycota, Mortierellaceae sin clasificar, *Mortierella* y *Mortierella alpina* del filo Mortierellomycota y *Olpidiaceae sp* perteneciente a Olpidiomycota.

Tabla 6.10 Afiliación taxonómica a nivel de especies de los OTUs representativos para cada variable estudiada a) procedencia del suelo, b) variedad de tomatera cultivada. Análisis realizado mediante la herramienta LEfSe

a)	Filo	Género o especie	Castellà	Hidalgo
		<i>Acremonium sclerotigenum</i>	4146	0
		<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	0	6959
		Ascomycota sin clasificar	7612	0
		<i>Aspergillus crustosus</i>	3941	0
		<i>Aspergillus spp</i>	22276	0
		Chaetomiaceae sin clasificar	425526	6883
		<i>Chaetomium jodhpurens</i>	2083	0
		<i>Chaetomium spp</i>	762	0
		<i>Cladosporium spp</i>	15853	0
		<i>Geomyces</i>	17381	0
		<i>Gibberella intricans</i>	117931	0
		<i>Gibellulopsis</i>	0	291376
		Hypocreales sin clasificar	2969	0
		<i>Leucothecium emdenii</i>	0	1822
		<i>Lophotrichus spp</i>	0	5970
	Ascomycota	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>	2997	0
		Microasceae sin clasificar	0	1149485
		Microascales sin clasificar	3322	0
		Nectriaceae sin clasificar	154876	0
		<i>Neocosmospora spp</i>	51196	0
		<i>Orbiliaceae sin clasificar</i>	7439	0
		<i>Penicillium spp</i>	8910	0
		Plectosphaerellaceae sin clasificar	18325	1908
		<i>Preussia spp</i>	3868	0
		<i>Pseudogymnoascus spp</i>	27623	0
		<i>Pseudombrophila bulbifera</i>	0	10431
		Sordariomycetes sin clasificar	1015	8590
		<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	87629	0
		Trichoderma sin clasificar	1353	0
		<i>Trichophaeopsis spp</i>	0	732982
		<i>Verticillium klebahnii</i>	0	8189
	Basidiomycota	<i>Wallemia spp</i>	83698	0
	Fungi sin clasificar	Hongo sin clasificar	3607	0
		<i>Mortierella alpina</i>	13754	0
	Mortierellomycota	<i>Mortierella oligospora</i>	0	529
		<i>Mortierella spp</i>	20140	0
		Mortierellaceae sin clasificar	125230	0
	Olpidiomycota	Olpidiaceae	60152	0
		<i>Olpidium spp</i>	7555	0

Tabla 6.10 Continuación

b)	Filo	Género o especie	Iniciales	Resistente	Susceptible
		<i>Acremonium chrysogenum</i>	1098	0	0
		<i>Arachniotus hebridensis</i>	322	0	0
		Ascomycota sin clasificar	0	2398	0
		<i>Aspergillus spp</i>	163	0	0
	Ascomycota	Ceratocystidaceae sin clasificar	0	0	7281
		Chaetomiaceae sin clasificar	3081	0	0
		<i>Cladosporium limoniforme</i>	290	0	0
		<i>Gymnoascus reessii</i>	1748	0	0
		Hypocreales sin clasificar	259	0	0
		<i>Pyrenochaeta inflorescentiae</i>	139	0	0
		Chytridiomycota	Chytridiomycota sin clasificar	431	0
	Fungi sin clasificar	Fungi sin clasificar	0	0	3196
	Mortierellomycota	Mortierellaceae sin clasificar	279	0	0

^Muestra de suelo sin sembrar y sin inocular

* en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico.

Finalmente, también se ha determinado el *core* fúngico global del ensayo, así como al de cada una de las variables analizadas. En la tabla 6.11 se puede observar que el *core* global es el mismo que el de la variedad Monika y el correspondiente a las réplicas con o sin tratamiento con *Trichoderma asperellum*. Este *core* consta de 4 taxones, 3 del filo Ascomycota (*Gibberella intricans*, Microascaceae sin clasificar y *Trichophaeopsis sp*) y las Mortierellaceae sin clasificar del filo Mortierellomycota. En las muestras de la variedad de tomatera *Durinta* aparece además un OTU del género *Fusarium*, y en las macetas con suelo de la parcela *Castellà* además del mismo *Fusarium*, también aparecen tres OTUs del filo Ascomycota, Nectriaceae sin clasificar, *Neocosmospora sp* y *Stachybotrys chlorohalonata*. Por último, en las muestras del suelo de la parcela *Hidalgo* se observa un OTU del género *Gibellulopsis* además de los OTUs del *core* general.

Tabla 6.11 OTUs que forman parte del *core* de la comunidad fúngica global y para cada variable a analizar (variedad de tomatera, procedencia del suelo y tratamiento). Análisis realizado mediante la herramienta Microbiome para R (90% de prevalencia y 0,5% de presencia)

Filotipo	Tamaño	Afiliación taxonómica		Goblal	Monika	Durinta	Inóculo de <i>Trichoderma</i>	Sin <i>Trichoderma</i>	Castellà	Hidalgo
		Filo	Especie ⁺							
6	302285		<i>Fusarium</i>							
79	352539		<i>Gibberella intricans</i>							
5	686414		<i>Gibellulopsis</i>							
2	4408860	Ascomycota	Microascaceae sin clasificar							
7	354377		Nectriaceae sin clasificar							
23	105605		<i>Neocosmospora</i> sp							
50	133147		<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>							
1	1922771		<i>Trichophaeopsis</i> sp							
14	334846	Mortierellomycota	Mortierellaceae sin clasificar							

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico.

6.1.3 Análisis del efecto de la inoculación de *Trichoderma asperellum* sobre la microbiota del suelo

En el apartado anterior hemos analizado todos los suelos inoculados con *Trichoderma asperellum* globalmente, con el objetivo de determinar si el inóculo tenía un efecto alterador en la estructura de las poblaciones bacterianas o fúngicas. Con dichos análisis se observó que se producían cambios concretos en la comunidad microbiana según el tipo de suelo y, en menor medida, según la variedad de tomatera cultivada, pero no se han observado cambios relevantes en cuanto a la presencia o no de inóculo del agente de biocontrol. Con la finalidad de profundizar en las diferencias entre las comunidades del suelo a las que se inoculó *Trichoderma asperellum* y las que no, se realizó una comparación de los diferentes bloques iguales (Castellà-Monika, CR; Castellà-Durinta, CS; Hidalgo-Monika, HR y Hidalgo-Durinta, HS), que únicamente diferían en si se había realizado el tratamiento con el agente de biocontrol.

Con tal propósito se ha realizado el estudio de las cuatro parejas mediante mothur. En primer lugar, se ha valorado si había diferencias significativas entre las parejas mediante Amova y Homova, para las poblaciones bacterias y fúngicas, y sólo se han hallado diferencias significativas en análisis mediante Amova correspondiente a las muestras de suelo *Castellà* con la variedad resistente de tomatera, respecto de la comunidad bacteriana. Aun así, se realizó la prueba LEfSe y se exploró el *core* de las muestras para cada pareja, tanto para la comunidad bacteriana como fúngica.

Comunidad bacteriana

El análisis mediante LEfSe muestra la misma heterogeneidad que venimos observando en apartados anteriores. En las tablas 6.12 y S6.3 queda manifiesto que existen cambios en los taxones dominantes cuando se comparan las muestras inoculadas con *Trichoderma asperellum* y sin inocular para cada pareja de las diferentes combinaciones de las variables (suelo y variedad vegetal). No obstante, los cambios observados para cada pareja son dispares. Solo se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se compara el conjunto de muestras inoculadas con el agente de

biocontrol con las no inoculadas, para el filo Bacteroidetes, y concretamente respecto al género *Ohtaekwangia*, los cuales están más representados en las muestras sin inóculo. Por otro lado, hay tres filos (Armatimonadetes, Chlamydiae y Gemmatimonadetes) que solo aparecen como representativos en muestras sin *Trichoderma asperellum* y tres (*Nitrospira*, Parcubacteria (OD1) y Spirochaetes) que son representativos únicamente en las muestras con el inóculo, pero estas sólo aparecen en una o dos muestras.

Tabla 6.12 Número de secuencias de cada filo bacteriano representativo para cada supuesto del ensayo según LEfSe.

Filo	Con <i>Trichoderma asperellum</i>				Sin inóculo			
	BCR [^]	BCS [^]	BHR [^]	BHS [^]	BCR [^]	BCS [^]	BHR [^]	BHS [^]
Acidobacteria	8875	5892	674	455	2730	2076	840	7369
Actinobacteria	15638	0	506	1559	2350	4900	2627	4831
Armatimonadetes	0	0	0	0	551	0	0	0
Bacteria sin clasificar*	19562	10868	9728	18755	3338	1725	9025	1474
Bacteroidetes*	1336	221	20315	6820	40100	33103	16808	28961
Chlamydiae	0	0	0	0	0	0	199	0
Firmicutes	15565	673	342	0	20619	1914	0	183
Gemmatimonadetes	0	0	0	0	876	0	0	0
Nitrospira	3002	3992	0	0	0	0	0	0
Parcubacteria (OD1)	0	0	203	0	0	0	0	0
Proteobacteria	39520	18867	18314	34529	31246	62880	14086	9754
Spirochaetes	0	0	0	208	0	0	0	0
Verrucomicrobia	0	212	921	867	6899	1606	1659	0

*diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las muestras con inóculo y todas las muestras sin inóculo.

[^]Las muestras se identifican mediante un código de tres caracteres. La primera letra del código de muestra indica que pertenecen al bacterioma; la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo* y la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*).

La tabla 6.13 muestra los OTUs presentes en el *core* de cada tipo de muestra. El análisis de los resultados muestra que en todas las parejas hay al menos una diferencia respecto al *core* global, en función de si las muestras están inoculadas con el agente de biocotrol o no lo están. Cabe resaltar, que en el caso de las macetas con suelo de la parcela Hidalgo, sembrado con la variedad de tomatera Durinta, el *core* es totalmente distinto en función de si ha sido inoculado o no con *Trichoderma*. Además, los filos Actinobacteria y Verrucomicrobia están únicamente en los *cores* correspondientes a las muestras sin inóculo.

Tabla 6.13 OTUs presentes en el core bacteriano de cada grupo de muestras. En gris los presentes, en blanco los ausentes.

OTU	Filo	Género ⁺	Con <i>Trichoderma asperellum</i>				Sin inóculo				
			BCR [^]	BCS [^]	BHR [^]	BHS [^]	BCR [^]	BCS [^]	BHR [^]	BHS [^]	
Otu00018	Acidobacteria	<i>Gp6</i>	■								
Otu00015	Actinobacteria	Actinomycetales sin clasificar					■				■
Otu00006		Flavobacteriaceae sin clasificar	■	■	■		■	■	■	■	
Otu00009		Flavobacteriaceae sin clasificar	■	■	■		■	■	■	■	
Otu00010	Bacteroidetes	<i>Ohtaekwangia</i>	■	■	■		■	■	■	■	
Otu00004		<i>Pontibacter</i>	■	■	■		■	■	■	■	
Otu00011		<i>Pontibacter</i>	■	■	■		■	■	■	■	
Otu00017		<i>Lysinibacillus</i>					■				■
Otu00003	Firmicutes	<i>Sporosarcina</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu00002		<i>Cellvibrio</i>		■	■		■	■	■	■	■
Otu00013		<i>Pseudomonas</i>			■		■	■	■	■	
Otu00005	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	■	■	■		■	■	■	■	■
Otu00008		<i>Sphingomonas</i>	■	■	■		■	■	■	■	■
Otu00007		<i>Steroidobacter</i>	■	■	■		■	■	■	■	■
Otu00012	Verrucomicrobia	Subdivision 3 sin clasificar						■	■	■	■

[^]Las muestras se identifican mediante un código de tres caracteres. La primera letra del código de muestra indica que pertenecen al bacterioma, C: *Castellà* o H: *Hidalgo* y la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*).

⁺en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico.

Comunidad fúngica

En la tabla 6.14 se muestran las especies representativas según LEfSe cuando se comparan las macetas en las que se ha inoculado el agente de control biológico y las que no. Cuando se comparan las muestras dos a dos, podemos observar que las poblaciones representativas son siempre diferentes, pero al igual que en el caso de la comunidad bacteriana se observa heterogeneidad, aunque estos cambios no dan lugar a patrones característicos, ni las diferencias significativas. Tanto Basidiomycota como Oplidiomycota pueden ser considerados biomarcadores únicamente en las muestras inoculadas con *Trichoderma*, y solo en las macetas con suelos de la parcela Castellá. *Trichophaeopsis* se muestra como un género representativo en las distintas réplicas de suelo Hidalgo no inoculado.

Respecto a los *cores* correspondientes al conjunto de réplicas de cada una de las muestras (Tabla 6.15) podemos observar, al igual que en el caso de bacterias que siempre hay al menos un cambio en los *cores* cuando comparamos los pares con o sin *Trichoderma asperellum*. Además, el OTU 0018 (*Aspergillus* sp) sólo forma parte del *core* en las macetas con suelo de la parcela Castellà inoculada con *Trichoderma asperellum*, mientras que *Mortierella alpina* sólo está presente en las que no han sido inoculadas. Cabe resaltar que los *cores* correspondientes a las macetas con suelo de la parcela Castellà presentan más diversidad de OTUs fúngicos que las correspondientes a la parcela Hidalgo.

Tabla 6.14 Número de secuencias de las especies fúngicas representativas para cada supuesto del ensayo según LEfSe.

Filo	Especie*	Con <i>Trichoderma asperellum</i>				Sin inóculo			
		FCR	FCS	FHR	FHS	FCR	FCS	FHR	FHS
Ascomycota	<i>Plectosphaerella melonis</i>	571	0	0	0	0	0	0	0
	Chaetomiaceae sin clasificar	0	0	0	573	0	125268	0	0
	<i>Chaetomium jodhpurens</i>	1402	0	0	0	0	0	0	0
	Sordariomycetes sin clasificar	27060	0	5421	0	0	5009	0	0
	Fusarium sin clasificar	0	156408	0	0	29028	0	0	0
	<i>Gibberella intricans</i>	0	70762	0	0	25639	0	0	0
	<i>Metarhizium indigoticum</i>	0	5657	0	0	0	0	0	0
	Cladosporium sin clasificar	0	0	0	0	0	7875	0	0
	<i>Aspergillus crustosus</i>	0	0	0	0	0	1468	0	0
	Aspergillus sin clasificar	0	0	0	0	0	2981	0	0
	Penicillium sin clasificar	0	0	0	0	0	3704	0	0
	<i>Chrysosporium lobatum</i>	0	0	0	0	0	241	0	0
	<i>Pseudogymnoascus sp</i>	0	0	0	0	0	10184	0	0
	<i>Neocosmospora rubicola</i>	0	0	0	0	0	11718	0	0
	Ceratocystidaceae sin clasificar	0	0	0	0	0	3697	0	0
	Sordariales sin clasificar	0	0	0	0	0	16191	0	0
	<i>Pyronemataceae sp</i>	0	0	460	0	0	0	0	0
	<i>Trichophaeopsis sp</i>	0	0	0	0	0	0	507	558294
	Microascaceae sin clasificar	0	0	0	712349	0	0	0	0
	Basidiomycota	<i>Saitozyma</i> sin clasificar	0	3809	0	0	0	0	0
Mortierellomycota	<i>Mortierella alpina</i>	0	0	0	0	0	6827	0	0
	Mortierella sin clasificar	8846	0	0	1004	0	0	0	0
Olpidiomycota	<i>Olpidiaceae sp</i>	415	0	0	0	0	0	0	0

Las muestras se identifican mediante un código de tres caracteres. La primera letra del código de muestra indica que pertenecen al micobioma; la segunda, la procedencia del suelo, C: Castellà o H: Hidalgo y la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (Monika) o S: susceptible (Durinta).

* en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico.

Tabla 6.15 OTUs presentes en el core del microbioma de cada grupo de muestras. En gris los presentes, en blanco los ausentes.

OTU	Filo	Especie ⁺	Con <i>Trichoderma asperellum</i>				Sin inóculo				
			FCR	FCS	FHR	FHS	FCR	FHR	FHR		
Otu0018	Ascomycota	<i>Aspergillus</i> sp	■	■							
Otu0002		Chaetomiaceae sin clasificar	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0006		<i>Fusarium</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0015		<i>Fusarium</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0007		<i>Gibberella intricans</i>	■		■				■		
Otu0012		<i>Gibellulopsis</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0001		Microasceae sin clasificar	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0010		<i>Neocosmospora rubicola</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0013		<i>Neocosmospora rubicola</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0014		<i>Pseudogymnoascus</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0016		<i>Pseudogymnoascus</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0009		Sordariales sin clasificar	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0011		Sordariomycetes sin clasificar	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0004		<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0008		<i>Trichophaeopsis</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0005		Basidiomycota	<i>Wallemia</i> sp	■	■	■	■	■	■	■	■
Otu0021	Mortierellomycota	<i>Mortierella alpina</i>					■				
Otu0023		<i>Mortierella alpina</i>						■			
Otu0017		<i>Mortierella</i> sp	■								
Otu0003		Mortierellaceae sin clasificar	■		■	■	■	■	■	■	■

Las muestras se identifican mediante un código de tres caracteres. La primera letra del código de muestra indica que pertenecen al microbioma; la segunda, la procedencia del suelo, C: Castellà o H: Hidalgo y la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (Monika) o S: susceptible (Durinta).

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico.

6.2 Discusión

En este ensayo se ha valorado la presencia de parasitismo fúngico en los huevos de *Meloidogyne incognita*, la presencia del nematodo, así como de sus huevos en macetas inoculadas con *Trichoderma asperellum* y sin inocular. Los resultados obtenidos, publicados por el grupo dirigido por FJ Sorribas²³³, mostraron una diferencia significativa en la presencia de huevos de *Meloidogyne incognita* en las macetas tratadas con *Trichoderma asperellum* entre las sembradas con la variedad *Durinta* y las de la variedad *Monika*, teniendo estas últimas un menor porcentaje de huevos. Este resultado era el mismo para la variable suelo (parcela *Castellà* o *Hidalgo*). Además, todas las muestras no inoculadas con *Trichoderma asperellum* presentaban una proporción de huevos superior que en las inoculadas. Respecto del porcentaje de huevos parasitados no había diferencias significativas entre las muestras.

La inoculación de macroorganismos no autóctonos en cualquier ambiente tiene impacto sobre la comunidad microbiana del mismo, para valorar el efecto de la inoculación de *Trichoderma asperellum* en este ensayo se realizó un análisis mediante Illumina Miseq. Los resultados obtenidos muestran una elevada heterogeneidad entre las muestras y sus réplicas, que se reafirma en los dendrogramas obtenidos al comparar la similitud entre las mismas mediante un análisis de *clusters* (Figura 6.2 y Figura 6.4). Cuando analizamos las muestras basándonos en las tres variables analizadas (procedencia del suelo, variedad cultivada y presencia/ausencia de agente de biocontrol) se observan diferencias en las comunidades microbianas cuando se comparan los tipos de suelos (*Castellà* e *Hidalgo*) y en algunos casos en función de la variedad de tomatera cultivada (*Monika* y *Durinta*). La presencia o ausencia de inoculo de *Trichoderma asperellum* no modifica en gran medida la comunidad microbiana, además la poca prevalencia del hongo observada en las muestras inoculadas (Tabla 6.7) podría sugerir que una inoculación inicial no modifica las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de tomatera y que sería necesario inocular regularmente para asegurar su prevalencia, y en ese caso, se podría valorar si se modifica la estructura de las poblaciones microbianas.

Respecto a la variable inoculación del agente de biocontrol, los filos bacterianos Bacteroidetes y Chlamydiae, se presentan en un porcentaje superior en las muestras sin el inóculo (tabla 6.3), encontrándose ambos filos también en mayor porcentaje en los suelos conductivos (capítulo 2). Aunque el filo Bacteroidetes en menor proporción en los suelos supresivos, se mantiene alrededor de un 10%, que, aun siendo inferior al observado en suelos conductivos, constituye una parte importante de la microbiota del suelo. Dentro de este filo, la familia Chitinophagaceae se mantiene en el *core* de todas las variables estudiadas (Tabla 6.9) y es más abundante en los suelos sin inóculo (Tabla 6.4 y Tabla S6.3), así que es posible que miembros de esta familia desempeñen un papel a nivel de supresividad, sobre todo cuando no hay inóculo, ya que se han reportado actividades supresivas frente a nematodos fitopatógenos, como la actividad quitinasa^{236,237}. En cuanto a la comunidad fúngica no se encuentran diferencias significativas en las muestras de hongos respecto de esta variable (Tabla 6.6 y Tabla 6.7). Cabe resaltar que tampoco se encuentran diferencias significativas utilizando el algoritmo LEfSe para ninguna de las dos comunidades. Sin embargo, cuando estudiamos el *core* de los suelos inoculado con *Trichoderma asperellum* y no inoculados, y lo comparamos con el *core* global, se puede observar que hay una familia (Streptomyetaceae) y un género que pueden tener relevancia y función supresora contra *M. incognita*. La familia Streptomyetaceae (tabla 6.9) es la única familia bacteriana que produce crisofanol^{238,239}, una antraquinona con potencial terapéutico de amplio espectro e importancia ecológica, resaltando su actividad antihémica contra *Meloidogyne incognita* J2s²⁴⁰. Otro género de importancia es *Sporosarcina*, el cual se encontraba en el *core* de suelos supresivos en el capítulo anterior, así como en otros trabajos realizados en suelos con capacidad supresora de plagas¹¹⁹, con lo que puede jugar un papel importante en la supresividad. Como se puede observar en la tabla 6.7 las secuencias pertenecientes a *Trichoderma* no se han detectado en las macetas inoculadas con este agente de biocontrol, por lo tanto, se puede inferir que *Trichoderma* no se ha establecido en el sistema o no está presente en un porcentaje detectable. En la comunidad fúngica no hay diferencias en ninguna de las pruebas que hemos realizado comparando las macetas inoculadas con las no inoculadas.

En anteriores estudios se ha probado que la variedad de la especie vegetal cultivada puede modificar la diversidad microbiana de la rizosfera^{96,97}. De la misma manera, en el estudio que aquí se presenta, se ha puesto de manifiesto que la variedad de tomatera cultivada tiene un efecto más profundo sobre la composición taxonómica de la comunidad microbiana que la presencia o ausencia de inóculo de agente de biocontrol. Comparando los porcentajes de los filos de bacterias detectados se ha observado que el filo Verrucomicrobia está más representado en las macetas correspondientes a la variedad Durinta. Algunos trabajos lo describen como un filo asociado a suelos infectados por nematodos²⁴¹ o como endosimbiontes de éstos^{242,243}, por lo que podría ser indicativo de un mayor parasitismo por nematodos.

El análisis mediante LEfSe de las variedades de tomatera nos muestra dos filos representativos de la variedad Monika, Acidobacteria y Gemmatimonadetes. Las Acidobacteria se presentaban en un porcentaje superior en los suelos supresivos descritos en el capítulo anterior, concretamente se detectó el subgrupo *GP4* como indicativo de microbiomas *supresivos*²⁰⁴. El filo Gemmatimonadetes está asociado con tratamientos contra *Meloidogyne*²⁴⁴, aunque no se ha descrito una relación directa, podría estar relacionado con la mejora del rendimiento de la planta²⁴⁵. Entre los taxones representativos del bacterioma de las muestras de la variedad Monika, también se han descrito otros géneros beneficiosos para las plantas, como agentes de control biológico entre otras capacidades, seguidamente se describen algunos de ellos. *Dyadobacter*, se caracteriza por ser fijador de N₂²⁴⁶. *Sphingobium* está presente en muestras agrícolas afectadas por *Meloidogyne*^{241,247}, además de tratarse de un género con una gran capacidad degradadora de compuestos complejos²⁴⁸. *Sphingomonas* está asociado a la rizosfera y con el desarrollo de quistes en plantas infectadas con RKN²⁴⁹, y se trata de un género claramente asociado con la producción de fitohormonas²⁵⁰. *Methylophilus* es un género promotor del crecimiento de plantas, con capacidad de solubilizar fosfatos²⁵¹, producir sideróforos y ácido indolacético; así como con actividad ACC (1-Aminociclopropano-1-Carboxylato) *deaminasa*²⁵². *Nannocystis* se caracteriza por ser un agente de control biológico contra *Aspergillus*²⁵³. *Pseudoxanthomonas* es una bacteria que es capaz de controlar *M. incognita*²¹⁹. Cabe

destacar, como en el capítulo anterior la presencia del género *Sporosarcina*, asociado a supresión de plagas. El único microorganismo representativo de la comunidad microbiana de las muestras de Monika que podría ser perjudicial para la planta es *Cellvibrio*, este se ha encontrado en agallas²⁴¹ y puede facilitar la penetración del nematodo a través de la raíz²⁵⁴.

Por otra parte, dos filos (*Armatimonadetes* y *Planctomycetes*) representativos de la variedad Durinta pero que no aparecen como biomarcadores de la variedad Monika. El filo *Armatimonadetes* se ha encontrado en la endosfera²⁵⁵, y en plantas contaminadas con aceites²⁵⁶, mientras que el filo *Planctomycetes* se ha encontrado en suelos infectados con *Meloidogyne incognita*²⁴¹. Son filos poco estudiados pero reseñados en muchos estudios relativos a la rizosfera y a microorganismos endófitos²⁵⁷, aunque desconoce su función. Cabe resaltar también el filo *Verrucomicrobia*, que, aunque no solo es representativo de variedad Durinta, cuenta con muchas más secuencias que en las muestras de variedad Monika. De los géneros considerados biomarcadores de la variedad Durinta, hallados mediante el algoritmo LEfSe y también presentes en el *core*, sólo dos tendrían interés como supresores de enfermedades o beneficiosos para las plantas según la bibliografía consultada. El primero de ellos, *Flavobacterium*, productor de toxinas anti juveniles de *Meloidogyne*²⁵⁸ y con actividad quitinasa²⁵⁹, ambas características explicarían que se encuentren en suelos supresores²⁰¹, e incluso formando parte de consorcios contra RKN²⁶⁰. También se han aislado de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas, y es considerado promotor del crecimiento de la planta²⁶¹. El segundo es *Azoarcus*, una rizobacteria promotora del crecimiento de plantas²⁶², e inductora de la respuesta defensiva de las mismas²⁶³. En el análisis del microbioma core, podemos observar que el género *Fusarium* forma parte de las macetas sembradas con Durinta, no así en el *core* de las muestras de la variedad Monika (tabla 6.11).

También hemos observado que cuando se comparan los microorganismos representativos de los suelos asociados a las dos variedades de tomatera estudiadas, aparecen más taxones relacionados con la supresión de nematodos o que son promotores del crecimiento de plantas en la rizosfera de la variedad Monika, que en la

de Durinta. Esto puede sugerir que hay una relación en cuanto a la selección de la microbiota por la propia planta en relación a una mejor estrategia para combatir patógenos, como *M. incognita* en este caso.

Al realizar el análisis comparativo de la microbiota del suelo según la variedad de planta sembrada, también se ha tenido en cuenta una tercera variable, las dos muestras iniciales, estas correspondían a muestras de suelos de las parcelas Castellà e Hidalgo sin sembrar ni inocular los juveniles de *M. incognita*. En la figura 6.1 y la figura 6.2 podemos observar que hay dos filos bacterianos, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, y dos filos fúngicos, *Mortierellomycota* y *Chytridiomycota*, que solo aparecen como representativos, según la herramienta LEfSe, en estas muestras iniciales, y una vez sembradas las tomateras, pierden ese papel de representatividad.

Los análisis estadísticos han mostrado que el tipo de suelo es la variable que más diferencias significativas presenta a nivel de composición de las poblaciones microbiana. Para que esto no enmascare posibles diferencias entre las macetas con o sin inóculo de *Trichoderma asperellum*, se han realizado pruebas estadísticas comparando las tres réplicas con inóculo y las tres sin el inóculo de cada uno de las condiciones estudiadas (procedencia del suelo y variedad de tomatera sembrada). Esta comparación reveló que entre la microbiota asociada al suelo de las muestras con y sin inóculo se producen cambios en los taxones representativos así como en el core. Sin embargo, cuando observamos globalmente los resultados, los patrones de cambio no son estables, y taxones que dejan de ser representativos en unas muestras al inocular *Trichoderma*, aparecen en otras, por ejemplo, *Gibberella intricans* (Tabla 6.14). Esto explicaría que cuando se analizan todas las muestras con o sin el inóculo en conjunto no observáramos diferencias reseñables, a diferencia de lo que sucedía al tener en cuenta las variables procedencia del suelo o variedad de tomatera. Estos cambios debidos a las características del suelo original o a la planta cultivada se siguen observando en los posteriores análisis (tablas 6.12, 6.13, 6.14 y S6.3). En el capítulo anterior se puso de manifiesto que el filo Bacteroidetes era representativo de suelos conductivos, mientras que aquí lo es de los que no han sido inoculados con *Trichoderma asperellum* los cuales también han mostrado ser menos supresivos²³³.

Dentro del filo *Bacteroidetes*, *Ohtaekwangia*, está más presente en las muestras sin inóculo, y representantes de éste género están relacionados con supresión de enfermedades de plantas^{207,264,265}. Aun teniendo unas valores de supresión más bajos sin inóculo²³³, estos suelos ya eran supresivos; de esta manera, es posible que el género *Ohtaekwangia* tuviera un papel destacado antes de la adición de *Trichoderma asperellum*.

Representantes de la familia Olpidiaceae y del género *Aspergillus* presentan especies parásitas de *Meloidogyne*^{266,267}. Estos dos taxones son componentes fundamentales de la microbiota de los suelos de la parcela *Castellà*. Secuencias de la familia Olpidiaceae son representativas del microbioma del suelo de la parcela *Castellà* (Tabla 6.10b), concretamente de las que han sido inoculadas con *Trichoderma asperellum* (Tabla 6.14). Miembros del género *Aspergillus* forman parte de los taxones relevantes según LEfSe (Tabla 6.10b) y del *core* de suela *Castellà* (Tabla 6.15). Cabe resaltar este género, ya que forma parte del *core* de las muestras de *Castellà* con inóculo de *Trichoderma asperellum*. Algunas de las especies con capacidad nematocida se detallan a continuación. *Aspergillus niger* es un parásito de huevos de nematodo²⁶⁸, *Aspergillus oryzae* ha demostrado actividad contra *Meloidogyne incognita*²⁶⁹. Además, numerosas especies de *Aspergillus* han sido descritas en la bibliografía en referencia al tratamiento de *Meloidogyne* con *Trichoderma*^{270–272}, así que podría tener una gran importancia en la interacción con *Trichoderma* para el biocontrol de *M. incognita*.

Capítulo 7. Discusión general

El microbioma vegetal es reconocido por ser diverso y complejo²⁷³ y tener un papel destacado en el desarrollo de las plantas³⁶⁻³⁹. El bacterioma de diversas especies vegetales ha sido descrito, pero hay una escasez de información sobre el micobioma vegetal^{61,62}. Berg sostiene que la integración de las interacciones fúngicas-bacterianas será relevante y que el microbioma vegetal será fundamental en el ámbito de la biotecnología vegetal y en concreto para el desarrollo de estrategias de fitomejora²⁷⁴. Por ello en este trabajo se ha tratado de caracterizar taxonómicamente el bacterioma y el micobioma de diversas especies vegetales, tanto de la filosfera como del suelo asociado a las raíces de la planta.

El primer reto planteado fue el uso de tres técnicas moleculares dependientes de PCR para el análisis del microbioma de filosfera de peral y manzano, con el objetivo de comparar sus puntos fuertes y débiles. En cuanto a la comparación de la riqueza encontrada con el uso de las diferentes técnicas, es significativamente ($p < 0,05$) superior la de genotecas a la de las DGGEs y mediante la secuenciación masiva respecto a la de genotecas (Tabla 4.21). En lo que respecta a los índices de diversidad de Shannon y Chao se sigue este mismo patrón, aunque no siempre se encuentran diferencias significativas. En cambio, el índice de Equidad no solo no es mayor en las muestras analizadas con secuenciación masiva, sino que es inferior, lo que muestra que la secuenciación masiva disminuye la homogeneidad en la diversidad y los OTUs más abundantes están sobreestimados. En cuanto a la afiliación filogenética de los géneros más abundantes coinciden en su mayor parte las tres metodologías (Tabla 4.22).

Otro de los objetivos del presente estudio era describir el *core* correspondiente a la comunidad microbiana presente a lo largo de todo el desarrollo fenológico de *Malus domestica* y *Pyrus communis*. Para ello se tuvieron en cuenta aquellas poblaciones que estaban presentes en al menos un 90% de las muestras estudiadas y que además su abundancia fuera como mínimo del 0,5%. El *core* del bacterioma de ambas especies, lo forman *Methylobacterium* y *Sphingomonas*, según el estudio mediante genotecas (Tabla 4.6). Cuando el estudio se lleva a cabo mediante secuenciación masiva en la plataforma Illumina Miseq el *core* de *Pyrus communis* coincide con el *core* global de

genotecas, pero además aparece el género *Deinococcus* (Tabla 4.23). El microbioma correspondiente al *core* de *Malus domestica*, extraído a partir del análisis de las genotecas, lo configuran *Alternaria* spp, *Aureobasidium proteae* y *Cladosporium* spp del filo Ascomycota y el género *Vishniacozyma* del filo Basidiomycota. La diferencia respecto al de peral es la ausencia de *Aureobasidium proteae* (Tabla 4.9). Sin embargo, cuando analizamos las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva el *core* de peral se circunscribe a dos únicos géneros *Cladosporium* y *Vishniacozyma* (Tabla 4.23).

El tercer punto de interés sobre el estudio del microbioma de la filosfera de peral y manzano se refiere a la sucesión de las poblaciones microbianas a lo largo del desarrollo fenológico del árbol. Se han observado diferencias en la composición de los microbiomas en los diferentes estados fenológicos, tanto en el caso de las poblaciones bacterianas como las fúngicas. Los estadios de brotación y prefloración forman un grupo diferenciado de postfloración y cuajado del fruto. La fase de floración es el periodo de transición entre ambos grupos y se relacionan de manera más estrecha con uno u otro grupo, dependiendo de las poblaciones microbianas o de la técnica utilizada (Figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.6). El estado de maduración del fruto es el más diferente al resto y o bien se asocia a los estadios iniciales, o es totalmente diferente al resto. Existen diferencias significativas entre estos grupos, tanto en los índices de diversidad, como en la taxonomía de las poblaciones que constituyen las comunidades en cada una de las etapas del desarrollo fenológico del árbol.

Respecto del bacterioma, las etapas intermedias las forman floración, postfloración y cuajado del fruto, los géneros que representativos esta fase en las diferentes técnicas son *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Truepera* y *Clostridium*. Las etapas iniciales, brotación y prefloración están caracterizadas por *Sphingomonas*, *Hymenobacter*, *Methylobacterium* y *Massilia*. El estadio de maduración del fruto comparte la mayoría de los géneros con los de las etapas iniciales, aunque está compuesto, además, por otros 4 géneros característicos: *Telluria*, *Buttiauxella*, *Escherichia* y *Pantoea* (Tablas 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.17, 4.19 y 4.20).

En relación al microbioma, se evidencian cambios a nivel de filo en las sucesiones entre las etapas iniciales (brotación, prefloración y floración) y las finales (postfloración y cuajado del fruto y maduración del fruto). Aunque también en este caso, la etapa de maduración del fruto es la más diferenciada. En las etapas iniciales se caracterizan por el filo Basidiomycota, y en concreto por el género *Vishniacozyma*, mientras que el filo Ascomycota es el relevante en el resto de estadios, siendo el género *Alternaria* el más representativo, aunque también el género *Filobasidium* está presente en el core de estas etapas finales.

Este estudio ha permitido mostrar que la microbiota de la filosfera está constituida por multitud de microorganismos beneficiosos para el desarrollo de las plantas, cómo *Methylobacterium*¹⁷⁹, *Sphingomonas*¹⁷⁸, *Massilia*¹⁹³, *Vishniacozyma*¹⁸² o *Aureobasidium proteae*^{187,189–192}. También se ha identificado *Pantoea* y su correlación negativa a lo largo del ciclo fenológico con *Erwinia amylovora* (Tabla 4.24), el agente patógeno causal del fuego bacteriano¹⁶⁸. Este comportamiento, así como el estadio en el que aparece, aporta información útil para el desarrollo de estrategias de biocontrol mediante *Pantoea* en momentos específicos del desarrollo fenológico del árbol.

En el estudio del microbioma de la filosfera, la comparación de los resultados obtenidos con las tres técnicas moleculares puso de manifiesto que respecto a la caracterización de la composición microbiana de las poblaciones más abundantes (>1%) las tres técnicas proporcionaban resultados equivalentes. Por ello, en el estudio de la rizosfera de suelos supresivos para RKN se utilizó solamente la DGGE y la secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq. En primer lugar, se utilizó *fingerprinting* para corroborar que existían diferencias en la comunidad microbiana de la rizosfera, según la capacidad supresiva del suelo; y una vez confirmada la hipótesis inicial se realizó una secuenciación masiva de las muestras representativas para profundizar en el conocimiento de los componentes alfa y β -de la diversidad microbiana mediante herramientas bioinformáticas.

El análisis comparativo del microbioma de suelos supresivos y conductivos para el nemátodo *Meloidogyne spp.*, los resultados obtenidos con ambas técnicas han

mostrado diferencias significativas tanto a nivel de índices de diversidad, como en la composición microbiana (figuras 5.3, 5.4, 5.10 y tablas 5.3, 5.8 y 5.12). Tal y como ya se había publicado anteriormente para otras especies vegetales, la diversidad es mayor en los suelos supresivos que en los conductivos^{204,205}. El objetivo, por lo tanto, ha sido encontrar cuales son los microorganismos característicos de los suelos supresivos, tanto como integrantes del microbioma *core*, así como biomarcadores, que se diferencien de los conductivos.

En el *core* de los suelos supresivos se encuentra un género bacteriano, que no está presente en el *core* de los suelos conductivos, *Sporosarcina*, y una clase, Actinomycetales. Respecto del *core* de las poblaciones fúngicas, son característicos 2 géneros *Pseudombrophila* y *Cladosporium* y dos familias más Chaetomiaceae y Mortierellaceae (Tablas 5.14 y 5.15). Tanto *Sporosarcina*, como *Cladosporium* son dos géneros que incluyen especies que actúan como agentes de biocontrol contra otras enfermedades vegetales^{227,228,275}.

En cuanto a los biomarcadores de suelos supresivos hallados mediante el algoritmo LEfSe (Figura 5.11 y 5.13, y tablas S5.2 y S5.4) tienen especial relevancia dos subgrupos del filo Acidobacteria. Tanto, los géneros del subgrupo Gp6, como los del subgrupo Gp4 han sido descritos como agentes de biocontrol^{119,207}, e incluso relacionados con suelos supresivos²⁰⁴. Otros géneros encontrados como biomarcadores de suelos supresivos y con actividad de biocontrol son, *Lysobacter*^{208,209}, *Pasteuria*^{210,211}, *Rubrobacter*²¹², *Pseudoxanthomonas*^{218,219}, *Virgibacillus*^{221,222}, *Halomonas* y *Halobacillus*^{213–217}. De los biomarcadores de las poblaciones fúngicas destacar *Mortierella alpina*, un hongo supresor de *Meloidogyne*²³¹.

Todos los géneros citados anteriormente, tienen potencial como determinantes de la supresividad del suelo. En futuros trabajos hay dos posibles líneas a seguir en este ámbito, una sería la incorporación de alguno de los potenciales agentes de biocontrol en suelos conductivos, mediante repetidas inoculaciones, y observar la capacidad antagonista sobre *Meloidogyne* spp., con el propósito de establecer una posible asociación entre el cambio del microbioma del suelo i la capacidad supresiva del

mismo. La otra sería buscar interacciones entre estos microorganismos y otros presentes en el suelo y favorecer el desarrollo de consorcios que puedan aumentar la resiliencia de los agentes de biocontrol.

En el capítulo 6 de este trabajo se ha estudiado el impacto sobre el microbioma de la rizosfera de la inoculación de *Trichoderma asperellum*, así como de la siembra de dos variedades de tomatara, una resistente y otra susceptible a *Meloidogyne incognita*. El estudio se realizó en macetas con suelo perteneciente a las dos fincas con mayor capacidad supresora de las estudiadas en el capítulo anterior. La comunidad microbiana se ha analizado con una única técnica molecular, secuenciación masiva en la plataforma Illumina Miseq. De las tres variables estudiadas, la que más diferencias ha generado respecto a la composición taxonómica, bacteriana y fúngica, de la rizosfera ha sido la procedencia del suelo, seguido de la variedad de tomatara, y por último la presencia de inóculo del agente de biocontrol. El bajo impacto en la microbiota de la rizosfera del inóculo puede estar relacionada con la prácticamente nula prevalencia del *T. asperellum* en las macetas al final del experimento (Tabla 6.7).

La abundancia relativa de los filos Bacteroidetes y Chlamydiae está negativamente correlacionada con la presencia de inóculo de forma significativa ($p < 0,05$). La familia Chitinophagaceae del filo Bacteroidetes está relacionada con la capacidad antihémica por su producción de quitinasa. Esta familia está presente en el core de todas las variables estudiadas, pero es significativamente más abundante en las muestras sin inóculo (Tabla 6.4), y también es un biomarcador (LEfSe) de todas las muestras sin inóculo (tabla S6.3). De la misma manera que lo expuesto en la introducción respecto de que la adición de fertilizantes disminuía la diversidad de microorganismos porque no se necesita la cooperación fisiológica⁶⁹, este descenso en la abundancia de Chitinophagaceae puede estar inducido ya que los compuestos orgánicos volátiles que produce *Trichoderma asperellum* incrementan la actividad quitinasa de las especies vegetales²⁷⁶.

La familia Streptomycetaceae y el género *Sporosarcina* son los únicos dos taxones característicos del core de los suelos supresoras, ambos pueden tener relevancia en la

posible cooperación con *Trichoderma asperellum* dada su actividad como agentes de biocontrol^{119,240}

La comparación entre la microbiota presente en función de la variedad de planta cultivada ha puesto de manifiesto marcadas diferencias entre ambas variedades de tomatera ensayadas, tanto a nivel de abundancia relativa, como en lo que respecta a los filotipos biomarcadores y el microbioma *core* característico de ambas. Entre estas diferencias cabe destacar que, en la rizosfera de las muestras con cultivos de la variedad Monika, tanto los biomarcadores, como los microorganismos presentes en el *core*, hay más que tienen descrita actividad de biocontrol, que en las muestras de Durinta. Algunos ejemplos de esto son, el subgrupo Gp4²⁰⁴ del filo Acidobacteria, el filo Gemmatimonadetes^{244,245}, *Dyadobacter*²⁴⁶, *Sphingobium*^{241,247}, *Sphingomonas*²⁴⁹, *Methylophilus*^{251,252}, *Nannocystis*²⁵³, *Pseudoxanthomonas*²¹⁹ y *Sporosarcina*¹¹⁹. Esto explicaría la manera en que cada variedad vegetal adquiere la resistencia a los nematodos, corroborando tanto que la variedad puede seleccionar un microbioma diferente^{96,97}, como que la resistencia de la planta a una enfermedad puede venir dada por la microbiota asociada⁵³.

No obstante, la variable que aportaba más diferencias a nivel de comunidad microbiana era la procedencia del suelo, no la inoculación de *Trichoderma asperellum*. Para poder evaluar el impacto de la inoculación de este agente de biocontrol se realizó una comparación individualizada donde la única variable modificada era la inoculación de *Trichoderma asperellum*, esto demostró que se producían cambios tanto en los biomarcadores como en el *core* (tablas 6.12, 6.13, 6.14 y S6.3). Los resultados obtenidos no han permitido obtener un patrón de microorganismos que acompañan a *Trichoderma asperellum* y explicaría por qué no se observaban cambios al comparar todas las muestras en función de la presencia/ausencia de inóculo. El único género que está significativamente ($p < 0,05$) más representado como biomarcador (LEfSe) en las muestras sin el inóculo es *Ohtaekwangia* lo que podría indicar que estamos ante un caso similar al de la familia Chitinophagaceae, ya que también está relacionado con la supresión de enfermedades vegetales^{207,264,265}.

Nuestra aportación a futuros trabajos es que debería comprobarse si una inoculación periódica del *T. asperellum* o la creación un consorcio en el que esté presente aumenta la resiliencia del agente de biocontrol y su capacidad para transformar la microbiota de la rizosfera.

El conocimiento del microbioma del agroecosistema, tanto de la filosfera, como de la rizosfera, en las diferentes condiciones ensayadas, será de gran ayuda para sentar las bases de una utilización práctica del microbioma del agroecosistema como un elemento clave en pro de unas buenas prácticas agrícolas enfocadas en garantizar la sostenibilidad ambiental.

Capítulo 8. Conclusiones

- 1- Las tres técnicas moleculares utilizadas en este estudio, DGGE, genotecas y secuenciación masiva, han proporcionado resultados equivalentes en cuanto a la composición taxonómica de las poblaciones bacterianas y fúngicas dominantes de la filosfera de *Malus domestica* y *Pyrus comunis*.
- 2- Illumina MiSeq proporciona una profundidad taxonómica superior a la DGEE y las genotecas convencionales, no obstante, se obtienen índices de Equidad inferiores. Este incremento de la heterogeneidad es un artefacto de la técnica, ya que sobreestima los OTUs más abundantes.
- 3- El *core* del bacterioma de la filosfera de las especies vegetales estudiadas está constituido por los géneros *Methylobacterium*, *Sphingomonas* y *Deinococcus*.
- 4- El *core* del microbioma de la filosfera de las especies vegetales estudiadas está constituido por los géneros *Cladosporium*, *Vishniacozyma*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, y miembros de la clase Dothideomycetes.
- 5- La sucesión del bacterioma de la filosfera a lo largo de las distintas fases del ciclo fenológico de las especies vegetales estudiadas se puede explicar mediante dos modelos. Uno circular donde se distinguen dos grupos, uno que reúne los estadios iniciales y finales del ciclo vegetativo y el otro, los intermedios. Y un modelo de tres *clusters* dónde también se separan los estadios iniciales del final.
- 6- Se han podido establecer biomarcadores del modelo circular. Proteobacterias y Bacteroidetes son representativos de los estadios iniciales y final, mientras que, Firmicutes lo es de las etapas intermedias. Respecto al modelo de tres clusters solo se ha podido establecer el biomarcador de las etapas iniciales, Saccharibacteria.
- 7- En la sucesión del microbioma de la filosfera a lo largo de las distintas fases del ciclo fenológico de las especies vegetales estudiadas, las tres fases iniciales forman un grupo compacto y a medida que avanza en el ciclo fenológico, su

- disimilitud es mayor. Los biomarcadores de las tres fases iniciales son los Basidiomycota y de las restantes son los Ascomycota.
- 8- La composición taxonómica del microbioma de la rizosfera de suelos supresivos para *Meloidogyne spp* exhibe marcadas diferencias con los suelos conductivos.
 - 9- El *core* del bacterioma de suelos supresivos está compuesto por 9 filos (Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia), resaltando la presencia de *Sporosarcina*, como un género exclusivo de esta tipología de suelos. Los biomarcadores del bacterioma de los estos suelos son los filos Acidobacteria, Actinobacteria y Firmicutes
 - 10- Los taxones *Pseudombrophila*, Chaetomaiaceae, *Cladosporium* y Morteriellaceae son característicos del *core* del micobioma de suelos supresivos. Los biomarcadores de esta tipología de suelos son los géneros *Cladosporium*, *Pyrenochaeta*, *Arachniotus*, *Pseudogymnoascus*, *Pseudombrophila* y *Morteriella*.
 - 11- El microbioma *core* de los suelos supresivos en los ensayos en maceta es equivalente al obtenido en los estudios de campo.
 - 12- Según los datos obtenidos en los ensayos en maceta, los factores determinantes en la composición taxonómica de la microbiota del suelo rizosferico son en orden decreciente de importancia, la tipología del suelo y la variedad vegetal. No se puede valorar el efecto de *Trichoderma asperellum* dada la falta de prevalencia de este agente de biocontrol en el suelo.
 - 13- La falta prevalencia de *Trichoderma asperellum* en los ensayos en maceta, podría resolverse mediante la inoculación periódica del agente de biocontrol o a través del desarrollo de un consorcio microbiano.

9. Bibliografía

1. Kareiva P, Watts S, McDonald R, Boucher T. Domesticated nature: Shaping landscapes and ecosystems for human welfare. *Science* (80-). 2007;316(5833):1866-1869. doi:10.1126/science.1140170
2. Popp A, Calvin K, Fujimori S, et al. Land-use futures in the shared socio-economic pathways. *Glob Environ Chang.* 2017;42:331-345. doi:10.1016/j.gloenvcha.2016.10.002
3. Bodirsky BL, Rolinski S, Biewald A, Weindl I, Popp A, Lotze-Campen H. Global food demand scenarios for the 21st century. *PLoS One.* 2015;10(11):e0139201. doi:10.1371/journal.pone.0139201
4. Siebert S, Döll P. Quantifying blue and green virtual water contents in global crop production as well as potential production losses without irrigation. *J Hydrol.* 2010;384(3-4):198-217. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.07.031
5. Steffen W, Richardson K, Rockstrom J, et al. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* (80-). 2015;347(6223):1259855-1259855. doi:10.1126/science.1259855
6. Wilson EO. *Half-Earth: Our Planet's Fight for Life.* Norton & Company; 2016.
7. Folberth C, Khabarov N, Balkovič J, et al. The global cropland-sparing potential of high-yield farming. *Nat Sustain.* 2020;3(4):281-289. doi:10.1038/s41893-020-0505-x
8. Glass ADM. Nitrogen Use Efficiency of Crop Plants: Physiological Constraints upon Nitrogen Absorption. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2003;22(5):453-470. doi:10.1080/07352680390243512
9. Schmer MR, Vogel KP, Varvel GE, Follett RF, Mitchell RB, Jin VL. Energy Potential and Greenhouse Gas Emissions from Bioenergy Cropping Systems on Marginally Productive Cropland. Hu S, ed. *PLoS One.* 2014;9(3):e89501. doi:10.1371/journal.pone.0089501
10. Conley DJ. Ecology: Save the baltic sea. *Nature.* 2012;486(7404):463-464.

doi:10.1038/486463a

11. La Moncloa. 19/11/2019. Agricultura, Pesca y Alimentación [España/España Hoy 2018-2019/Agricultura]. <https://www.lamoncloa.gob.es/espana/eh18-19/agricultura/Paginas/agriculturayganaderia.aspx>. Accessed November 4, 2020.
12. Global Warming of 1.5 °C —. <https://www.ipcc.ch/sr15/>. Accessed November 4, 2020.
13. Cocuzza GEM, Alberto U, Hernández-Suárez E, et al. A review on Trioza erytreae (African citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of huanglongbing (HLB) in citrus. *J Pest Sci (2004)*. 2017;90(1):1-17. doi:10.1007/s10340-016-0804-1
14. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol*. 2004;19(10):535-544. doi:10.1016/j.tree.2004.07.021
15. Waage JK, Mumford JD. Agricultural biosecurity. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2008;363(1492):863-876. doi:10.1098/rstb.2007.2188
16. Stukenbrock EH, McDonald BA. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annu Rev Phytopathol*. 2008;46(1):75-100. doi:10.1146/annurev.phyto.010708.154114
17. McKinney ML, Lockwood JL. Biotic homogenization: A few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends Ecol Evol*. 1999;14(11):450-453. doi:10.1016/S0169-5347(99)01679-1
18. Bebber DP, Holmes T, Gurr SJ. The global spread of crop pests and pathogens. *Glob Ecol Biogeogr*. 2014;23(12):1398-1407. doi:10.1111/geb.12214
19. Oberto R, Indig -C Isneros L, Odolfo R, Irzo D, Rancisco F, Spinosa -G Arcía JE. Effects of domestication and agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in Phaseolus beans. *Ecol Res*. 2002;17:315-321. doi:10.1046/j.0912-

3814.2002.00491.x

20. International Year of Plant Health 2020 | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/plant-health-2020/about/en/>. Accessed November 4, 2020.
21. Ayres MP, Lombardero MJ. Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *Sci Total Environ.* 2000;262(3):263-286. doi:10.1016/S0048-9697(00)00528-3
22. McNEW G. The nature, origin and evolution of parasitism. *HORSFALL, J G; DIMOND, AE (Ed) Plant Pathol an Adv treatise New York, Acad Press.* 1960.
23. Talavera M, Sayadi S, Chiroso-Ríos M, Salmerón T, Flor-Peregrín E, Verdejo-Lucas S. Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain. *Nematology.* 2012;14(5):517-527. doi:10.1163/156854112x635850
24. Djian-Caporalino C. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), a growing problem in French vegetable crops. *EPPO Bull.* 2012;42(1):127-137. doi:10.1111/j.1365-2338.2012.02530.x
25. Huang T -C., Burr TJ. Characterization of plasmids that encode streptomycin-resistance in bacterial epiphytes of apple. *J Appl Microbiol.* 1999;86(5):741-751. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00719.x
26. Schnabel EL, Jones AL. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4898-4907. doi:10.1128/aem.65.11.4898-4907.1999
27. Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):1875-1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
28. Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Edited by J. L. Vanneste. 16 × 24 cm, 370 pp. Wallingford, UK: CABI [<http://www.cabi.org>], 2000. £65. ISBN 0-85199-294-3 (hardback). *Plant Pathol.* 2001;50(3):418.

doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00436-2.x

29. ZHU D, CHEN Q, DING J, WANG Y, CUI H, ZHU Y. Antibiotic resistance genes in the soil ecosystem and planetary health: Progress and prospect. *Sci Sin Vitae*. 2019;49(12):1652-1663. doi:10.1360/ssv-2019-0267
30. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol*. 2006;40(23):7445-7450. doi:10.1021/es060413l
31. Al-Delaimy WK. Planetary Health and Population Health: the Anthropocene Requires Different Thinking and Approaches in Serving Public Health. *Curr Environ Heal reports*. 2018;5(4):397-400. doi:10.1007/s40572-018-0222-z
32. Sustainable Agriculture: Definitions and Terms | Alternative Farming Systems Information Center| NAL | USDA. <https://www.nal.usda.gov/afsic/sustainable-agriculture-definitions-and-terms>. Accessed November 6, 2020.
33. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticidesText with EEA relevance | Enhanced Reader. moz-extension://34adf42e-d7d1-48e4-9110-63e5deae9184/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Feur-lex.europa.eu%2FLEXUriServ%2FLEXUriServ.do%3Furi%3DOJ%3AL%3A2009%3A309%3A0071%3A0086%3Aen%3APDF. Accessed November 8, 2020.
34. Koberl M, M. E, Romann B, et al. Using Ecological Knowledge and Molecular Tools to Develop Effective and Safe Biocontrol Strategies. In: *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech; 2011. doi:10.5772/19700
35. Andrews JH. Biological Control in the Phyllosphere. *Annu Rev Phytopathol*. 1992;30(1):603-635. doi:10.1146/annurev.py.30.090192.003131
36. Zamioudis C, Pieterse CMJ. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2012;25(2):139-150. doi:10.1094/MPMI-06-11-0179

37. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):4951-4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005
38. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:541-556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
39. Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 2002;40:309-348. doi:10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010
40. Tkacz A, Poole P. Role of root microbiota in plant productivity. *J Exp Bot.* 2015;66(8):2167-2175. doi:10.1093/jxb/erv157
41. Doran JW, Sarrantonio M, Liebig MA. Soil Health and Sustainability. In: *Advances in Agronomy.* Vol 56. Academic Press Inc.; 1996:1-54. doi:10.1016/S0065-2113(08)60178-9
42. Marschner H. *Mineral Nutrition of Higher Plants.* 2nd ed. London: Academic Press; 1995.
43. Upadhyay SK, Singh DP. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Papen H, ed. *Plant Biol.* 2015;17(1):288-293. doi:10.1111/plb.12173
44. Yang J, Kloepper JW, Ryu CM. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 2009;14(1):1-4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004
45. Berg G, Grube M, Schloter M, Smalla K. Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Front Microbiol.* 2014;5(JUN):148. doi:10.3389/fmicb.2014.00148
46. Hosni T, Moretti C, Devescovi G, et al. Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *ISME J.* 2011;5(12):1857-

1870. doi:10.1038/ismej.2011.65
47. Miller MB, Bassler BL. Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55(1):165-199. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165
48. Mathesius U, Mulders S, Gao M, et al. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):1444-1449. doi:10.1073/pnas.262672599
49. Hartmann A, Schikora A. Quorum Sensing of Bacteria and Trans-Kingdom Interactions of N-Acyl Homoserine Lactones with Eukaryotes. *J Chem Ecol.* 2012;38(6):704-713. doi:10.1007/s10886-012-0141-7
50. Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2000;13(6):637-648. doi:10.1094/MPMI.2000.13.6.637
51. Roberts PA. Concepts and consequences of resistance. In: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CABI; 2009:23-41. doi:10.1079/9780851994666.0023
52. Williamson VM, Roberts PA. Mechanisms and genetics of resistance. In: *Root-Knot Nematodes*. CABI Publishing; 2009:301-325. doi:10.1079/9781845934927.0301
53. Schouten A. Mechanisms Involved in Nematode Control by Endophytic Fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 2016;54(1):121-142. doi:10.1146/annurev-phyto-080615-100114
54. Shores M, Harman GE, Mastouri F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol.* 2010;48:21-43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450
55. Elad Y, Freeman S. Biological Control of Fungal Plant Pathogens. In: *Agricultural Applications*. Springer Berlin Heidelberg; 2002:93-109. doi:10.1007/978-3-662-03059-2_6
56. Last FT. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Trans Br Mycol*

- Soc. 1955;38(3):221-239. doi:10.1016/s0007-1536(55)80069-1
57. RUINEN J. Occurrence of Beijerinckia Species in the 'Phyllosphere.' *Nature*. 1956;177(4501):220-221. doi:10.1038/177220a0
 58. Woodward FI, Lomas MR. Vegetation dynamics - Simulating responses to climatic change. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2004;79(3):643-670. doi:10.1017/S1464793103006419
 59. Leveau JH, Lindow SE. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3446-3453. doi:10.1073/pnas.061629598
 60. Knief C, Delmotte N, Vorholt JA. Bacterial adaptation to life in association with plants - A proteomic perspective from culture to in situ conditions. *Proteomics*. 2011;11(15):3086-3105. doi:10.1002/pmic.201000818
 61. Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(12):828-840. doi:10.1038/nrmicro2910
 62. Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu Rev Genet*. 2016;50(1):211-234. doi:10.1146/annurev-genet-120215-034952
 63. Morris CE, Monier JM, Jacques MA. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(12):4789-4795. doi:10.1128/aem.64.12.4789-4795.1998
 64. Andrews JH, Spear RN, Nordheim E V. Population biology of Aureobasidium pullulans on apple leaf surfaces. *Can J Microbiol*. 2002;48(6):500-513. doi:10.1139/w02-044
 65. Delmotte N, Knief C, Chaffron S, et al. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(38):16428-16433. doi:10.1073/pnas.0905240106

66. Knief C, Delmotte N, Chaffron S, et al. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J.* 2012;6(7):1378-1390. doi:10.1038/ismej.2011.192
67. Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow T V, Coaker GL, Leveau JHJ. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J.* 2012;6(10):1812-1822. doi:10.1038/ismej.2012.32
68. Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol.* 2008;105(6):1744-1755. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x
69. Venkatachalam S, Ranjan K, Prasanna R, Ramakrishnan B, Thapa S, Kanchan A. Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. *Plant Biol (Stuttg).* 2016;18(4):627-637. doi:10.1111/plb.12441
70. Costa LEDO, Queiroz MVD, Borges AC, Moraes CAD, E.F.D. A. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Braz J Microbiol.* 2012;43(4). doi:10.1590/S1517-838220120004000041
71. Kim M, Singh D, Lai-Hoe A, et al. Distinctive Phyllosphere Bacterial Communities in Tropical Trees. *Microb Ecol.* 2012;63(3):674-681. doi:10.1007/s00248-011-9953-1
72. Kadivar H, Stapleton AE. Ultraviolet Radiation Alters Maize Phyllosphere Bacterial Diversity. *Microb Ecol.* 2003;45(4):353-361. doi:10.1007/s00248-002-1065-5
73. Suda W, Nagasaki A, Shishido M. Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. *Microbes Environ.* 2009;24(3):217-223. doi:10.1264/jsme2.ME09114
74. Fürnkranz M, Wanek W, Richter A, Abell G, Rasche F, Sessitsch A. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J.*

- 2008;2(5):561-570. doi:10.1038/ismej.2008.14
75. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2013;64(1):807-838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106
76. Rastogi G, Coaker GL, Leveau JHJ. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;348(1):1-10. doi:10.1111/1574-6968.12225
77. Demarée GR, Rutishauser T. Origins of the Word “Phenology.” *Eos, Trans Am Geophys Union.* 2009;90(34):291-291. doi:10.1029/2009eo340004
78. fenología | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE. <https://dle.rae.es/fenología?m=form>. Accessed November 8, 2020.
79. Odum EP. The strategy of ecosystem development. *Science (80-).* 1969;164(3877):262-270. doi:10.1126/science.164.3877.262
80. Francioli D, Schulz E, Buscot F, Reitz T. Dynamics of Soil Bacterial Communities Over a Vegetation Season Relate to Both Soil Nutrient Status and Plant Growth Phenology. *Microb Ecol.* 2018;75(1):216-227. doi:10.1007/s00248-017-1012-0
81. Buscardo E, Geml J, Schmidt SK, Freitas H, Da Cunha HB, Nagy L. Spatio-temporal dynamics of soil bacterial communities as a function of Amazon forest phenology. *Sci Rep.* 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-22380-z
82. Wagner MR, Lundberg DS, Coleman-Derr D, Tringe SG, Dangl JL, Mitchell-Olds T. Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Ecol Lett.* 2014;17(6):717-726. doi:10.1111/ele.12276
83. Redford AJ, Fierer N. Bacterial Succession on the Leaf Surface: A Novel System for Studying Successional Dynamics. *Microb Ecol.* 2009;58(1):189-198. doi:10.1007/s00248-009-9495-y
84. Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere

- microbial ecology and soil bacteriology research. In: *Plant and Soil*. Vol 312. Springer; 2008:7-14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z
85. Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;68(1):1-13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
 86. Herron PM, Gage DJ, Pinedo CA, Haider ZK, Cardon ZG. Better to light a candle than curse the darkness: Illuminating spatial localization and temporal dynamics of rapid microbial growth in the rhizosphere. *Front Plant Sci*. 2013;4(SEP). doi:10.3389/fpls.2013.00323
 87. Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*. 2012;17(8):478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001
 88. Berg G, Rybakova D, Grube M, Köberl M. The plant microbiome explored: Implications for experimental botany. *J Exp Bot*. 2016;67(4):995-1002. doi:10.1093/jxb/erv466
 89. Foster RC, Rovira AD, Cock TW. *Ultrastructure of the Root-Soil Interface*. St. Paul, Minn., U.S.A American Phytopathological Society; 1983. <http://openlibrary.org/books/OL3192273M>.
 90. Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil*. 2009;321(1-2):5-33. doi:10.1007/s11104-009-9925-0
 91. Rovira AD. Plant root exudates. *Bot Rev*. 1969;35(1):35-57. doi:10.1007/BF02859887
 92. Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*. 1998;30(3):369-378. doi:https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00124-7
 93. Germida JJ, Siciliano SD, Renato de Freitas J, Seib AM. Diversity of root-associated

- bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* 1998;26(1):43-50. doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb01560.x
94. Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil.* 2009;321(1-2):235-257. doi:10.1007/s11104-008-9814-y
95. Zhou W, Lu D, Qin S. Research progress in interaction between plant and rhizosphere microorganism. *J Jilin Agric Univ.* 2016;38:253-260. doi:10.13327/j.jjlau.2016.3073
96. Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Exp Bot.* 2009;60(6):1729-1742. doi:10.1093/jxb/erp053
97. Weinert N, Piceno Y, Ding G-C, et al. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011;75(3):497-506. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01025.x
98. Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature.* 2012;488(7409):86-90. doi:10.1038/nature11237
99. Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature.* 2012;488(7409):91-95. doi:10.1038/nature11336
100. Berg G, Eberl L, Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol.* 2005;7(11):1673-1685. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x
101. Berg G, Erlacher A, Smalla K, Krause R. Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'?' *Microb Biotechnol.* 2014;7(6):487-495. doi:10.1111/1751-7915.12159
102. Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to

- Cell. *Plant Physiol.* 1998;116(2):447-453. doi:10.1104/pp.116.2.447
103. Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: Potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;71(2):137-144. doi:10.1007/s00253-006-0380-z
104. Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 2003;133(1):16-20. doi:10.1104/pp.103.024380
105. Klopper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol.* 1992;38(12):1219-1232. doi:10.1139/m92-202
106. Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 2011;45:119-144. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132549
107. Normand P, Nguyen T Van, Battenberg K, et al. Proposal of 'candidatus frankia californiensis', the uncultured symbiont in nitrogen-fixing root nodules of a phylogenetically broad group of hosts endemic to western north america. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(10):3706-3715. doi:10.1099/ijsem.0.002147
108. Santi C, Bogusz D, Franche C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot.* 2013;111(5):743-767. doi:10.1093/aob/mct048
109. Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with acetobacter diazotrophicus wild-type and Nif- mutant strains. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2001;14(3):358-366. doi:10.1094/MPMI.2001.14.3.358
110. Jin CW, Ye YQ, Zheng SJ. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. *Ann Bot.* 2014;113(1):7-18. doi:10.1093/aob/mct249
111. Matthijs S, Tehrani KA, Laus G, Jackson RW, Cooper RM, Cornelis P. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium*

- activity. *Environ Microbiol.* 2007;9(2):425-434. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x
112. Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J Basic Microbiol.* 2013;53(12):972-984. doi:10.1002/jobm.201200445
113. Traxler MF, Seyedsayamdost MR, Clardy J, Kolter R. Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Mol Microbiol.* 2012;86(3):628-644. doi:10.1111/mmi.12008
114. El-Tarabily KA. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. In: *Canadian Journal of Botany.* Vol 84. ; 2006:211-222. doi:10.1139/B05-153
115. Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 2003;255:571-586. doi:10.2307/24123974
116. Baker K, Cook RJ. Biological control of plant pathogens. *Biol Control plant Pathog.* 1974.
117. Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(4):307-319. doi:10.1038/nrmicro1129
118. Griffiths BS, Ritz K, Wheatley R, et al. An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biol Biochem.* 2001;33(12-13):1713-1722. doi:10.1016/S0038-0717(01)00094-3
119. Li H, Cai X, Gong J, Xu T, Ding G, Li J. Long-Term Organic Farming Manipulated Rhizospheric Microbiome and *Bacillus* Antagonism Against Pepper Blight (*Phytophthora capsici*). *Front Microbiol.* 2019;10(FEB):342. doi:10.3389/fmicb.2019.00342
120. Coyne DL, Cortada L, Dalzell JJ, et al. Plant-Parasitic Nematodes and Food Security in Sub-Saharan Africa. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(1):381-403.

- doi:10.1146/annurev-phyto-080417-045833
121. Gheysen G, Mitchum MG. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Curr Opin Plant Biol.* 2011;14(4):415-421. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.012
 122. Abad P, Gouzy J, Aury J-M, et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat Biotechnol.* 2008;26(8):909-915. doi:10.1038/nbt.1482
 123. Gheysen G, Mitchum MG. Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. *Plant Cell Monogr.* 2009;15:45-81. doi:10.1007/978-3-540-85215-5_3
 124. Sasser JN, Freckman DW (1987) A world perspective of nematology: the role of the society. In: Veech JA, Dickson DW, editors. *Vistas on Nematol.* Hyattsville, MD: Society of Nematologists. pp. 7–14. - Open Access Library. <http://www.oalib.com/references/12909855>. Accessed January 30, 2020.
 125. Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2013;14(9):946-961. doi:10.1111/mpp.12057
 126. Sorribas FJ, Ornat C, Verdejo-Lucas S, Galeano M, Valero J. Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *Eur J Plant Pathol.* 2005;111(1):29-38. doi:10.1007/s10658-004-1982-x
 127. Talavera M, Verdejo-Lucas S, Ornat C, et al. Crop rotations with Mi gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses. *Crop Prot.* 2009;28(8):662-667. doi:https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.03.015
 128. Giné A, López-Gómez M, Vela MD, et al. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. *Plant Pathol.* 2014;63(6):1446-1453. doi:10.1111/ppa.12217

129. López-Gómez M, Gine A, Vela MD, et al. Damage functions and thermal requirements of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* on watermelon. *Ann Appl Biol*. 2014;165(3):466-473. doi:10.1111/aab.12154
130. Vela MD, Giné A, López-Gómez M, et al. Thermal time requirements of root-knot nematodes on zucchini-squash and population dynamics with associated yield losses on spring and autumn cropping cycles. *Eur J Plant Pathol*. 2014;140(3):481-490. doi:10.1007/s10658-014-0482-x
131. Timper P. Utilization of Biological Control for Managing Plant-Parasitic Nematodes. In: Davies K. SY, ed. *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*. Springer Netherlands; 2011:259-289. doi:10.1007/978-1-4020-9648-8_11
132. Chen S. Suppression of *Heterodera glycines* in soils from fields with long-term soybean monoculture. *Biocontrol Sci Technol*. 2007;17(2):125-134. doi:10.1080/09583150600937121
133. Westphal A, Becker JO. Components of soil suppressiveness against *Heterodera schachtii*. *Soil Biol Biochem*. 2001;33(1):9-16. doi:https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00108-5
134. Verdejo-Lucas S, Cortada L, Sorribas FJ, Ornat C. Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathol*. 2009;58(5):990-998. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02089.x
135. Wilson M, Lindow SE. Viable but Nonculturable Cells in Plant-Associated Bacterial Populations. In: *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Springer US; 2000:229-241. doi:10.1007/978-1-4757-0271-2_13
136. Rastogi G, Tech JJ, Coaker GL, Leveau JHJ. A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *J Microbiol Methods*. 2010;83(2):127-132. doi:10.1016/j.mimet.2010.08.006
137. Handelsman J, Smalla K. Techniques Conversations with the silent majority Editorial overview. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:271-273. doi:10.1016/S1369-

5274(03)00062-6

138. Yashiro E, Spear RN, Mcmanus PS. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *J Appl Microbiol.* 2011;110(5):1284-1296. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04975.x
139. Saito A, Ikeda S, Ezura H, Minamisawa K. Microbial Community Analysis of the Phytosphere Using Culture-Independent Methodologies. *Microbes Environ.* 2007;22(2):93-105. doi:10.1264/jsme2.22.93
140. Berlec A. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics. *Plant Sci.* 2012;193-194:96-102. doi:https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.010
141. Chelius MK, Triplett EW. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of Zea mays L. *Microb Ecol.* 2001;41(3):252-263. doi:10.1007/s002480000087
142. Probe Match. <https://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp?timeout=true>. Accessed November 7, 2020.
143. TestProbe. <https://www.arb-silva.de/search/testprobe/>. Accessed November 7, 2020.
144. Sivakumar N, Sathishkumar R, Selvakumar G, Shyamkumar R, Arjunekumar K. Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. In: *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*. Vol 25. Nature Publishing Group; 2020:113-172. doi:10.1007/978-3-030-38453-1_5
145. Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(2):316-322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593035>. Accessed September 26, 2018.
146. el Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, Top EM. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene

- fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):982-988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049851>. Accessed September 23, 2019.
147. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
148. GARDES M, BRUNS TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol.* 1993;2(2):113-118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
149. Withe T, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, Withe T, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1990:315-322.
150. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(3):695-700. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683183>. Accessed September 26, 2018.
151. Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(9):3131-3145. doi:10.1093/nar/13.9.3131
152. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73(1):127-141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9602286>. Accessed September 26, 2018.
153. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9(1):387-402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359

154. Andrew Rambaut, AJ Drummond. FigTree 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Published January 2018. Accessed May 6, 2020.
155. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, et al. *Package "vegan" Title Community Ecology Package.*; 2018. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>. Accessed September 26, 2018.
156. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. doi:ISBN: 3-900051-07-0
157. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
158. Madden TL, Tatusov RL, Zhang J. [9] Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* 1996;266:131-137. doi:10.1016/s0076-6879(96)66011-x
159. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7537-7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
160. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* September 2017. doi:10.1093/bib/bbx108
161. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012;41(D1):D590-D596. doi:10.1093/nar/gks1219
162. Nilsson RH, Larsson K-H, Taylor AFS, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D259-D264. doi:10.1093/nar/gky1022
163. Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60

164. Louca S, Parfrey LW, Doebeli M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*. 2016;353(6305):1272-1277. doi:10.1126/science.aaf4507
165. Lahti L et, Sudarshan S. Microbiome R package. 2012:<http://microbiome.github.io>.
166. Hernandez-Agreda A, Gates RD, Ainsworth TD. Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends Microbiol*. 2017;25(2):125-140. doi:10.1016/j.tim.2016.11.003
167. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
168. Malnoy M, Martens S, Norelli JL, et al. Fire Blight: Applied Genomic Insights of the Pathogen and Host. *Annu Rev Phytopathol*. 2012;50(1):475-494. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172931
169. Takahashi H, Sekiguchi H, Ito T, et al. Microbial community profiles in intercellular fluid of rice. *J Gen Plant Pathol*. 2011;77(2):121-131. doi:10.1007/s10327-010-0289-3
170. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012;6:1621-1624. doi:10.1038/ismej.2012.8
171. Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N. The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol*. 2010;12(11):2885-2893. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x
172. Shade A, McManus PS, Handelsman J. Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. *MBio*. 2013;4(2). doi:10.1128/mBio.00602-12

173. Anguita-Maeso M, Olivares-García C, Haro C, Imperial J, Navas-Cortés JA, Landa BB. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of the Olive Xylem Microbiota: Effect of Sap Extraction Methods. *Front Plant Sci.* 2020;10. doi:10.3389/fpls.2019.01708
174. Ulrich K, Becker R, Behrendt U, Kube M, Ulrich A. A Comparative Analysis of Ash Leaf-Colonizing Bacterial Communities Identifies Putative Antagonists of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Front Microbiol.* 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.00966
175. Zhang Q, Geng Z, Li D, Ding Z. Characterization and discrimination of microbial community and co-occurrence patterns in fresh and strong flavor style flue-cured tobacco leaves. *Microbiologyopen.* 2020;9(2). doi:10.1002/mbo3.965
176. Sivakumar N, Sathishkumar R, Selvakumar G, Shyamkumar R, Arjunekumar K. Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. In: *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*. Vol 25. Nature Publishing Group; 2020:113-172. doi:10.1007/978-3-030-38453-1_5
177. Wallace J, Laforest-Lapointe I, Kembel SW. Variation in the leaf and root microbiome of sugar maple (*Acer saccharum*) at an elevational range limit. *PeerJ.* 2018;6:e5293. doi:10.7717/peerj.5293
178. Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(10):3202-3210. doi:10.1128/AEM.00133-11
179. Gourion B, Rossignol M, Vorholt JA. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(35):13186-13191. doi:10.1073/pnas.0603530103
180. Díaz-Riaño J, Posada L, Acosta IC, et al. Computational search for UV radiation resistance strategies in *Deinococcus swuensis* isolated from Paramo ecosystems.

- PLoS One*. 2019;14(12). doi:10.1371/journal.pone.0221540
181. Pinto AJ, Raskin L. PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PLoS One*. 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043093
 182. Sun X, Kosman E, Sharon A. Stem endophytic mycobiota in wild and domesticated wheat: Structural differences and hidden resources for wheat improvement. *J Fungi*. 2020;6(3):1-19. doi:10.3390/jof6030180
 183. Huet S, Pouvreau JB, Delage E, et al. Populations of the Parasitic Plant *Phelipanche ramosa* Influence Their Seed Microbiota. *Front Plant Sci*. 2020;11. doi:10.3389/fpls.2020.01075
 184. Perelló A, Moreno M, Sisterna M. *Alternaria* infectoria species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathol*. 2008;57(2):379-379. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01713.x
 185. Gramisci BR, Lutz MC, Lopes CA, Sangorrín MP. Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. *Biol Control*. 2018;121:151-158. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.03.001
 186. van Nieuwenhuijzen EJ, Houbraken JAMP, Meijer M, Adan OCG, Samson RA. *Aureobasidium melanogenum*: a native of dark biofinishes on oil treated wood. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2016;109(5):661-683. doi:10.1007/s10482-016-0668-7
 187. Cosoveanu A, Gimenez-Mariño C, Cabrera Y, Hernández G, Cabrera R. Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopatogenic fungi. In: *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*; 2014.
 188. Setati ME, Jacobson D, Andong UC, Bauer F. The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052609

189. Di Francesco A, Di Foggia M, Baraldi E. Aureobasidium pullulans volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food Microbiol.* 2020;87. doi:10.1016/j.fm.2019.103395
190. Di Francesco A, Calassanzio M, Ratti C, Mari M, Folchi A, Baraldi E. Molecular characterization of the two postharvest biological control agents Aureobasidium pullulans L1 and L8. *Biol Control.* 2018;123:53-59. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.05.005
191. Di Francesco A, Zajc J, Gunde-Cimerman N, et al. Bioactivity of volatile organic compounds by Aureobasidium species against gray mold of tomato and table grape. *World J Microbiol Biotechnol.* 2020;36(11):171. doi:10.1007/s11274-020-02947-7
192. Zhang D, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. Efficacy of the antagonist Aureobasidium pullulans PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biol Control.* 2010;54(3):172-180. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.05.003
193. Silva UC, Medeiros JD, Leite LR, et al. Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere. *Front Microbiol.* 2017;8(JUL):1266. doi:10.3389/fmicb.2017.01266
194. Hayden HL, Savin KW, Wadeson J, Gupta VVSR, Mele PM. Comparative metatranscriptomics of wheat Rhizosphere microbiomes in disease suppressive and non-suppressive soils for Rhizoctonia solani AG8. *Front Microbiol.* 2018;9(MAY). doi:10.3389/fmicb.2018.00859
195. Dagher F, Olishavska S, Pillion V, Zheng J, Déziel E. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen Erwinia amylovora. *Heliyon.* 2020;6(10). doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05222
196. Bonn WG, Zwet T van der. Distribution and economic importance of fire blight. In: *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia Amylovora.* CABI; 2009:37-53. doi:10.1079/9780851992945.0037

197. Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS. *Fire Blight Management in the Twenty-First Century Using New Technologies That Enhance Host Resistance in Apple*. Vol 87.
198. Mcmanus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol.* 2002;40:443-465. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927
199. McGhee GC, Sundin GW. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 2011;101(2):192-204. doi:10.1094/PHYTO-04-10-0128
200. Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*). <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/organismos-nocivos/fuego-bacteriano/>. Accessed November 14, 2020.
201. Giné A, Carrasquilla M, Martínez-Alonso M, Gaju N, Sorribas FJ. Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic horticulture in plastic greenhouse. *Front Plant Sci.* 2016;7(FEB2016). doi:10.3389/fpls.2016.00164
202. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series*. Vol 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.; 1999:95-98.
203. Gilbert JA, Field D, Swift P, et al. The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: A “multi-omic” study of seasonal and diel temporal variation. *PLoS One*. 2010;5(11). doi:10.1371/journal.pone.0015545
204. Shen Z, Ruan Y, Xue C, Zhong S, Li R, Shen Q. Soils naturally suppressive to banana Fusarium wilt disease harbor unique bacterial communities. *Plant Soil*. 2015;393(1-2):21-33. doi:10.1007/s11104-015-2474-9
205. Yin C, Hulbert SH, Schroeder KL, et al. Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(23):7428-7438. doi:10.1128/AEM.01610-13

206. Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(7):2046-2056. doi:10.1128/AEM.02294-08
207. Ou Y, Penton CR, Geisen S, et al. Deciphering Underlying Drivers of Disease Suppressiveness Against Pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.02535
208. She S, Niu J, Zhang C, et al. Significant relationship between soil bacterial community structure and incidence of bacterial wilt disease under continuous cropping system. *Arch Microbiol.* 2017;199(2):267-275. doi:10.1007/s00203-016-1301-x
209. Lou L, Qian G, Xie Y, et al. Biosynthesis of HSAF, a tetramic acid-containing macrolactam from *Lysobacter enzymogenes*. *J Am Chem Soc.* 2011;133(4):643-645. doi:10.1021/ja105732c
210. Xiao Y, Liu X, Meng D, et al. The role of soil bacterial community during winter fallow period in the incidence of tobacco bacterial wilt disease. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(5):2399-2412. doi:10.1007/s00253-018-8757-3
211. Kariuki GM, Dickson DW. Transfer and Development of *Pasteuria penetrans*. *J Nematol.* 2007;39(1):55.
212. Siegel-Hertz K, Edel-Hermann V, Chapelle E, Terrat S, Raaijmakers JM, Steinberg C. Comparative microbiome analysis of a *Fusarium* wilt suppressive soil and a *Fusarium* wilt conducive soil from the Châteaurenard region. *Front Microbiol.* 2018;9(APR):568. doi:10.3389/fmicb.2018.00568
213. Zhang J, Wang P, Tian H, Tao Z, Guo T. Transcriptome Analysis of Ice Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterium *Halomonas* sp. Strain MC1 to Identify the Genes Involved in Salt Tolerance. *Microorganisms.* 2020;8(1):88. doi:10.3390/microorganisms8010088
214. Li X, Yu YH. Biodiversity and screening of halophilic bacteria with hydrolytic and antimicrobial activities from Yuncheng Salt Lake, China. *Biol.* 2015;70(2):151-156.

- doi:10.1515/biolog-2015-0033
215. Masmoudi F, Abdelmalek N, Tounsi S, Dunlap CA, Trigui M. Abiotic stress resistance, plant growth promotion and antifungal potential of halotolerant bacteria from a Tunisian solar saltern. *Microbiol Res.* 2019;229:126331. doi:10.1016/j.micres.2019.126331
216. Donio MBS, Ronica FA, Viji VT, et al. Halomonas sp. BS4, A biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. *Springerplus.* 2013;2(1):149. doi:10.1186/2193-1801-2-149
217. Bitzer J, Große T, Wang L, Lang S, Beil W, Zeeck A. New aminophenoxazinones from a marine Halomonas sp.: Fermentation, structure elucidation, and biological activity. *J Antibiot (Tokyo).* 2006;59(2):86-92. doi:10.1038/ja.2006.12
218. Akter S, Jo H, Du J, et al. Pseudoxanthomonas humi sp. nov., a bacterium isolated from rhizospheric soil of Fraxinus chinensis in Gyeonggi Province, South Korea. *Arch Microbiol.* 2015;197(10):1165-1172. doi:10.1007/s00203-015-1157-5
219. Hu Y, Li J, Li J, et al. Biocontrol efficacy of Pseudoxanthomonas japonensis against Meloidogyne incognita and its nematostatic metabolites. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(2). doi:10.1093/femsle/fny287
220. Anyasi RO, Atagana HI, Sutherland R. Identification and characterization of PAH-degrading endophytes isolated from plants growing around a sludge dam. *Int J Phytoremediation.* 2019;21(7):672-682. doi:10.1080/15226514.2018.1556585
221. Gupta V, Singh SS, Sidhu C, Grover V, Pinnaka AK, Korpole S. Virgicin, a novel lanthipeptide from Virgibacillus sp. strain AK90 exhibits inhibitory activity against Gram-positive bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(9):1-14. doi:10.1007/s11274-019-2707-9
222. Huang D, Yu C, Shao Z, et al. Identification and Characterization of Nematicidal Volatile Organic Compounds from Deep-Sea Virgibacillus dokdonensis MCCC 1A00493. *Molecules.* 2020;25(3):744. doi:10.3390/molecules25030744

223. Baquiran J-P, Thater B, Sedky S, De Ley P, Crowley D, Orwin PM. Culture-Independent Investigation of the Microbiome Associated with the Nematode *Acrobeloides maximus*. Badger JH, ed. *PLoS One*. 2013;8(7):e67425. doi:10.1371/journal.pone.0067425
224. Qureshi S, Viqar S, Ara J, Syed. Nematicidal potential of culture filtrates of soil fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of cultivated and wild plants. *Pakistan J Bot*. 2012;44.
225. Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol*. 2003;157(3):493-502. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x
226. Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, et al. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol*. 2007;58:105-156. doi:10.3114/sim.2007.58.05
227. Torres DE, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Guevara-Fefer P, Márquez-Guzmán GJ, Pérez-Martínez C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PLoS One*. 2017;12(1). doi:10.1371/journal.pone.0170782
228. Comby M, Gacoin M, Robineau M, et al. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different in vitro tests. *Microbiol Res*. 2017;202:11-20. doi:10.1016/j.micres.2017.04.014
229. Elhady A, Giné A, Topalovic O, et al. Microbiomes associated with infective stages of root-knot and lesion nematodes in soil. *PLoS One*. 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0177145
230. Adam M, Westphal A, Hallmann J, Heuer H. Specific microbial attachment to root knot nematodes in suppressive soil. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(9):2679-2686. doi:10.1128/AEM.03905-13
231. AL-Shammari T, Bahkali A, Elgorban A, Elkahky M, Al-Sum B. The Use of

- Trichoderma longibrachiatum and Mortierella alpina Against Root-Knot Nematode, Meloidogyne javanica on Tomato. *J Pure Appl Microbiol.* 2013;7:199-207.
232. Cortada L, Sorribas FJ, Ornat C, Kaloshian I, Verdejo-Lucas S. Variability in infection and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato rootstocks with the *Mi* resistance gene. *Plant Pathol.* 2008;57(6):1125-1135. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01906.x
233. Pocurull M, Fullana AM, Ferro M, et al. Commercial Formulates of Trichoderma Induce Systemic Plant Resistance to Meloidogyne incognita in Tomato and the Effect Is Additive to That of the Mi-1.2 Resistance Gene. *Front Microbiol.* 2020;10:3042. doi:10.3389/fmicb.2019.03042
234. Khan RAA, Najeeb S, Mao Z, et al. Bioactive secondary metabolites from Trichoderma spp. Against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms.* 2020;8(3). doi:10.3390/microorganisms8030401
235. Martínez-Medina A, Fernandez I, Lok GB, Pozo MJ, Pieterse CMJ, Van Wees SCM. Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by Trichoderma protects tomato against the root knot nematode Meloidogyne incognita. *New Phytol.* 2017;213(3):1363-1377. doi:10.1111/nph.14251
236. Kharade SS, McBride MJ. Flavobacterium johnsoniae chitinase ChiA is required for chitin utilization and is secreted by the type IX secretion system. *J Bacteriol.* 2014;196(5):961-970. doi:10.1128/JB.01170-13
237. del Rio TG, Abt B, Spring S, et al. Complete genome sequence of Chitinophaga pinensis type strain (UQM 2034 T). *Stand Genomic Sci.* 2010;2(1):87-95. doi:10.4056/sigs.661199
238. Malik EM, Müller CE. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. *Med Res Rev.* 2016;36(4):705-748. doi:10.1002/med.21391
239. Prateeksha, Yusuf MA, Singh BN, et al. Chrysophanol: A natural anthraquinone with multifaceted biotherapeutic potential. *Biomolecules.* 2019;9(2).

doi:10.3390/biom9020068

240. Tripathi B, Bhatia R, Pandey A, et al. Potential Antioxidant Anthraquinones Isolated from *Rheum emodi* Showing Nematicidal Activity against *Meloidogyne incognita*. Astiasaran I, ed. *J Chem*. 2014;2014:652526. doi:10.1155/2014/652526
241. Yergaliyev TM, Alexander-Shani R, Dimerets H, et al. Bacterial Community Structure Dynamics in *Meloidogyne incognita* -Infected Roots and Its Role in Worm-Microbiome Interactions. Kent AD, ed. *mSphere*. 2020;5(4). doi:10.1128/mSphere.00306-20
242. Coomans A, Vandekerckhove TTM, Claeys M. Transovarial transmission of symbionts in *Xiphinema brevicollum* (Nematoda: Longidoridae). *Nematology*. 2000;2(4):443-449. doi:10.1163/156854100509303
243. Vandekerckhove TTM, Willems A, Gillis M, Coomans A. Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum*-group species (Nematoda, Longidoridae). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50(6):2197-2205. doi:10.1099/00207713-50-6-2197
244. Colagiero M, Rosso LC, Catalano D, Schena L, Ciancio A. Response of Tomato Rhizosphere Bacteria to Root-Knot Nematodes, Fenamiphos and Sampling Time Shows Differential Effects on Low Level Taxa. *Front Microbiol*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.00390
245. Hannula SE, Ma H kun, Pérez-Jaramillo JE, Pineda A, Bezemer TM. Structure and ecological function of the soil microbiome affecting plant–soil feedbacks in the presence of a soil-borne pathogen. *Environ Microbiol*. 2020;22(2):660-676. doi:10.1111/1462-2920.14882
246. Kumar S, Suyal DC, Bhoriyal M, Goel R. Plant growth promoting potential of psychrotolerant *Dyadobacter* sp. for pulses and finger millet and impact of inoculation on soil chemical properties and diazotrophic abundance. *J Plant Nutr*. 2018;41(8):1035-1046. doi:10.1080/01904167.2018.1433211
247. Harkes P, van Steenbrugge JJM, van den Elsen SJJ, et al. Shifts in the Active

- Rhizobiome Paralleling Low *Meloidogyne chitwoodi* Densities in Fields Under Prolonged Organic Soil Management. *Front Plant Sci.* 2020;10:1. doi:10.3389/fpls.2019.01697
248. Cycon M, Piotrowska-Seget Z. Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: A review. *Front Microbiol.* 2016;7(SEP). doi:10.3389/fmicb.2016.01463
249. Topalović O, Hussain M, Heuer H. Plants and Associated Soil Microbiota Cooperatively Suppress Plant-Parasitic Nematodes. *Front Microbiol.* 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.00313
250. Bilal S, Shahzad R, Khan AL, et al. Endophytic microbial consortia of phytohormones-producing fungus *paecilomyces formosus* lhl10 and bacteria *sphingomonas* sp. lk11 to glycine max l. regulates physio-hormonal changes to attenuate aluminum and zinc stresses. *Front Plant Sci.* 2018;9. doi:10.3389/fpls.2018.01273
251. Agafonova N V., Kaparullina EN, Doronina N V., Trotsenko YA. Phosphate-solubilizing activity of aerobic methylobacteria. *Microbiol (Russian Fed.* 2013;82(6):864-867. doi:10.1134/S0026261714010020
252. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, Sa TM. *Methylophilus rhizosphaerae* sp. nov., a restricted facultative methylotroph isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(11):2904-2908. doi:10.1099/ijms.0.009811-0
253. Taylor WJ, Draughon FA. *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J Food Prot.* 2001;64(7):1030-1034. doi:10.4315/0362-028X-64.7.1030
254. DeBoy RT, Mongodin EF, Fouts DE, et al. Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. *J Bacteriol.* 2008;190(15):5455-5463. doi:10.1128/JB.01701-07
255. Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, et al. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front Microbiol.* 2017;8(DEC).

- doi:10.3389/fmicb.2017.02552
256. Kumar V, AlMomin S, Al-Aqeel H, Al-Salameen F, Nair S, Shajan A. Metagenomic analysis of rhizosphere microflora of oil-contaminated soil planted with barley and alfalfa. *PLoS One*. 2018;13(8). doi:10.1371/journal.pone.0202127
 257. Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(8):E911-E920. doi:10.1073/pnas.1414592112
 258. McClure MA. Neoplastic Growths in Preparasitic Juveniles of *Meloidogyne incognita*. *J Nematol*. 1989;21(3):427-430. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287632>. Accessed July 30, 2020.
 259. A. Veliz E, Martínez-Hidalgo P, M. Hirsch A. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiol*. 2017;3(3):689-705. doi:10.3934/microbiol.2017.3.689
 260. Toju H, Tanaka Y. Consortia of anti-nematode fungi and bacteria in the rhizosphere of soybean plants attacked by root-knot nematodes. *R Soc Open Sci*. 2019;6(3). doi:10.1098/rsos.181693
 261. Maimaiti J, Zhang Y, Yang J, et al. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. *Environ Microbiol*. 2007;9(2):435-444. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01155.x
 262. Hurek T, Reinhold-Hurek B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J Biotechnol*. 2003;106(2-3):169-178. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.07.010
 263. Miché L, Battistoni F, Gemmer S, Belghazi M, Reinhold-Hurek B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2006;19(5):502-511. doi:10.1094/MPMI-19-0502

264. Gao Y, Lu Y, Lin W, Tian J, Cai K. Biochar suppresses bacterial wilt of tomato by improving soil chemical properties and shifting soil microbial community. *Microorganisms*. 2019;7(12). doi:10.3390/microorganisms7120676
265. Xue C, Penton CR, Shen Z, et al. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep11124
266. Askar T, Martinelli PR. Nematophagous Fungi as Biocontrol Agents of Phytonematodes. In: *Biocontrol Agents of Phytonematodes*. Oxfordshire (UK), Boston (USA): CAB International; 2015:81-125.
267. Esser R, Schubert T. Fungi that utilize zoospores to parasitize nematodes. *Nematol Circ*. 1983;101:1-4.
268. Abd-Elgawad MMM, Askary TH. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. *Egypt J Biol Pest Control*. 2018;28(1):74. doi:10.1186/s41938-018-0080-x
269. Kim TY, Jang JY, Jeon SJ, et al. Nematicidal activity of kojic acid produced by *aspergillus oryzae* against *meloidogyne incognita*. *J Microbiol Biotechnol*. 2016;26(8):1383-1391. doi:10.4014/jmb.1603.03040
270. Yan XN, Sikora RA, Zheng JW. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12(3):219-225. doi:10.1631/jzus.B1000165
271. Sikandar A, Zhang M, Wang Y, et al. In vitro evaluation of *Penicillium chrysogenum* Snf1216 against *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). *Sci Rep*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-65262-z
272. Forghani F, Hajihassani A. Recent Advances in the Development of Environmentally Benign Treatments to Control Root-Knot Nematodes. *Front Plant Sci*. 2020;11. doi:10.3389/fpls.2020.01125
273. Müller T, Ruppel S. Progress in cultivation-independent phyllosphere

- microbiology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;87(1):2-17. doi:10.1111/1574-6941.12198
274. Berg G, Grube M, Schloter M, Smalla K. Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Front Microbiol.* 2014;5(JUN):148. doi:10.3389/fmicb.2014.00148
275. Li H, Cai X, Gong J, Xu T, Ding G, Li J. Long-Term Organic Farming Manipulated Rhizospheric Microbiome and *Bacillus* Antagonism Against Pepper Blight (*Phytophthora capsici*). *Front Microbiol.* 2019;10(FEB):342. doi:10.3389/fmicb.2019.00342
276. Wonglom P, Ito S ichi, Sunpapao A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecol.* 2020;43:100867. doi:10.1016/j.funeco.2019.100867

10.1 Anexo capítulo 3

Tabla S3.1 Reactivos, consumibles y enzimas utilizados y su distribuidor

Distribuidor	Producto
Bio-Rad	Acrilamida, APS (ammonium persulfate), resina Agr 501-X8, Tampón TAE x50, TEMED
Invitrogen	Taq polimerasa, Tampon de PCR 10x, Cloruro magnesio 50mM, Marcadores de ADN, fenol:cloroformo:alcohol, dNTPs, cebadores y reactivos del Qubit 3.0
New England Biolabs	Marcador 50 bp
Panreac	Glicerol, cloruro sódico, vaselina, Etanol 99%, X-gal
Conda	Medio LB
Sigma-Aldrich	Acetona grado HPLC ($\leq 99,9\%$ pureza), formamida, bromuro de etidio, tinte bromophenol-blue xylene-xyanole, agua calidad biología molecular y kanamicina
Boehringer Mannheim GmbH	Lisozima

Tabla S3.2 Funciones analizadas mediante la herramienta FAPROTAX

Función
Acetogénesis Reductora
Amonificación de Nitrato
Amonificación de Nitrito
Anammox
Bacterias Knallgas
Biorremediación de Petróleo
Celulolisis
Cianobacterias
Cloroplastos
Degradación de Compuestos Aromáticos
Degradación de Hidrocarburos
Degradación de Hidrocarburos Alifáticos No Metano.
Degradación de Hidrocarburos Aromáticos
Degradación Plástica
Depredador o Exoparasitario
Desintoxicación de Arsenato
Desintoxicación por Oxidación de Arsenito
Desnitrificación
Desnitrificación de Nitratos
Desnitrificación de Nitritos
Desnitrificación de Óxido Nitroso
Diarrea Patógenos Humanos
Fermentación
Fijación de Nitrogeno
Fotoautotrofia
Fotoautotrofia Anoxigena
Fotoautotrofia Anoxigena Fe Oxidante

Tabla S3.2 continuación

Función
Fotoautotrofia Anoxigena H ₂ Oxidante
Fotoautotrofia Anoxigénica S Oxidante
Fotoautotrofia Oxigenada
Fotoheterotrofia
Fototrofia
Fototrofia Aeróbica Anoxigénica
Gastroenteritis por Patógenos Humanos
Intestino de Mamífero
Intestino Humano
Ligninólisis
Meningitis Patógenos Humanos
Metanogénesis
Metanogénesis Acetoclástica
Metanogénesis Hidrogenotrófica
Metanogénesis por Desproporción de Grupos Metilo
Metanogénesis por Reducción de CO ₂ Con H ₂
Metanogénesis por Reducción de Compuestos Metílicos Con H ₂
Metanogénesis Usando Formiato
Metanotrofia
Metilotrofia
Neumonía por Patógenos Humanos
Nitrificación
Nosocomia Patógenos Humanos
Oxidación Aeróbica de Amoniacó
Oxidación Aeróbica de Nitrito
Oxidación de Azufre Oscuro
Oxidación de Hidrógeno Oscuro
Oxidación de Hierro Oscuro
Oxidación de Manganeseo
Oxidación de Metanol
Oxidación de Sulfito Oscuro
Oxidación de Sulfuro Oscuro
Oxidación de Tiosulfato Oscuro
Oxidación Disimilatoria Del Arsenito
Oxidación Oscura de Compuestos de Azufre
Parásitos Animales o Simbiontes
Parásitos de Peces
Parásitos Intracelulares
Parásitos Invertebrados
Patógeno Vegetal
Patógenos Humanos Todos
Producción de Energía de Oxidación Del Arsenito
Quimioheterotrofia
Quimioheterotrofia Aeróbica
Quitinólisis
Reducción de Arseniato Disimilatorio
Reducción de Nitratos
Reductores de Clorato
Respiración de Arsenato
Respiración de Azufre

Tabla S3.2 continuación

Función
Respiración de Compuestos de Azufre
Respiración de Hierro
Respiración de Manganeso
Respiración de Nitrato
Respiración de Nitrito
Respiración de Nitrógeno
Respiración de Sulfato
Respiración de Sulfito
Respiración de Tiosulfato
Respiración Fumarato
Septicemia de Patógenos Humanos
Ureólisis
Xilanólisis

10.2 Anexo suplementario capítulo 4

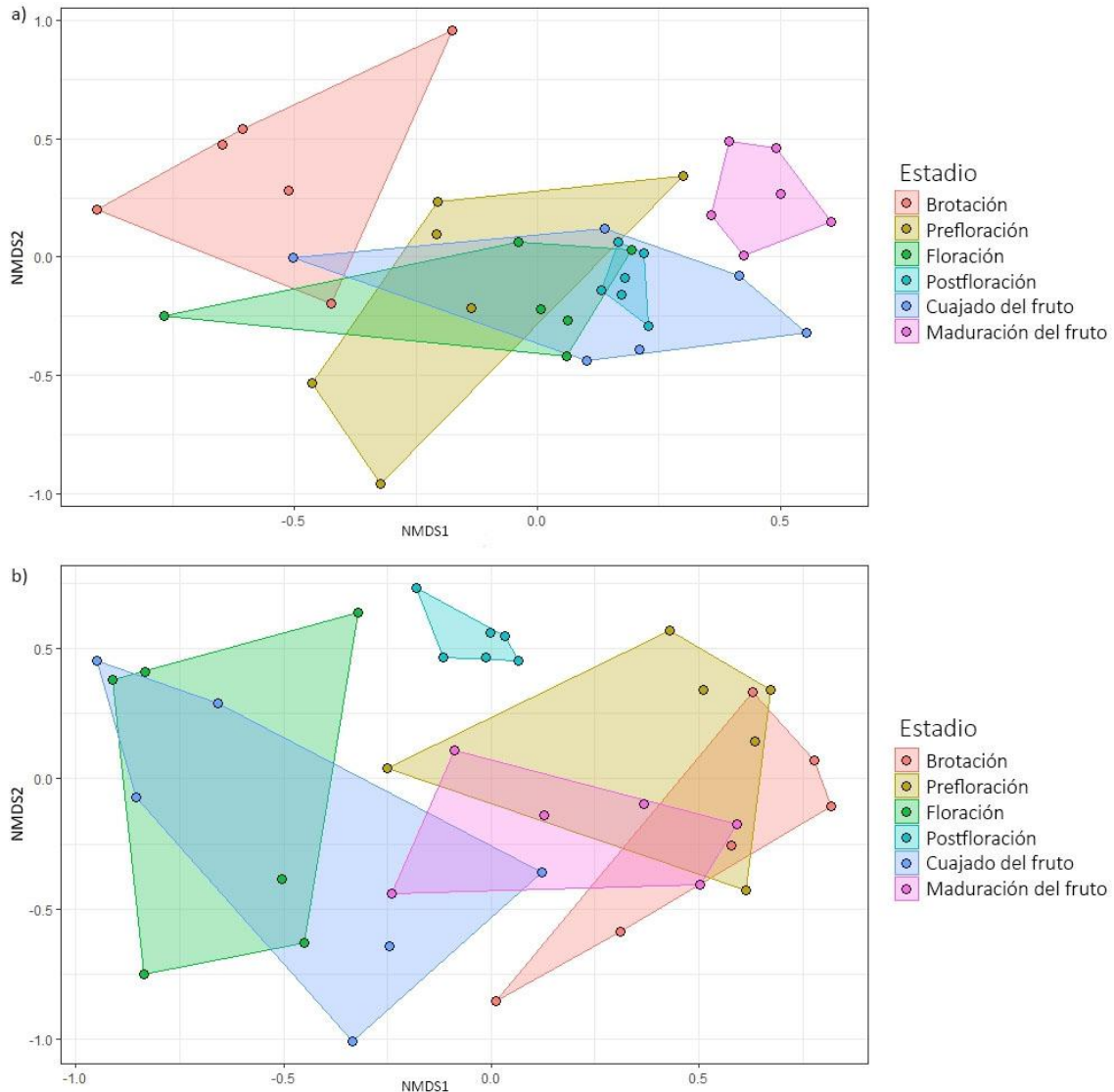


Figura S4.1 Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de las variaciones del microbioma de la filosfera de manzano (a) y peral (b) a lo largo del desarrollo fenológico del árbol, realizado a partir de la posición relativa de las bandas de los perfiles de DGGE utilizando el índice de similitud Bray-Curtis. Los puntos representados corresponden a las 36 muestras analizadas, seis réplicas de los seis estadios fenológicos estudiados de cada especie vegetal estudiada.

Tabla S4.1 Afiliación filogenética de las bandas recuperadas de los geles de DGGE pertenecientes a las muestras del microbioma de la filosfera manzano.

Afiliación filogenética	Código bandas	Homología (%)	Cultivable más cercano	Homología (%)	Clase	Filo
<i>Cladosporium no cultivable</i>	30, 111	100	<i>Cladosporium varians</i>	100		
<i>Cladosporium no cultivable</i>	106, 107	99,18 - 99,24	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i>	98,36 - 98,48		
<i>Davidiella tassiana</i>	13, 26, 47, 49, 57, 68, 69, 72, 73, 74, 90, 91	99,02 - 100	-	-		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	105, 108, 109	100	-	-		
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	101	96,53	-	-		
<i>Pseudocercospora humuli</i>	38	98,91	-	-		
Ascomycota no cultivable	4, 7, 11, 41, 93	99,53 - 100	<i>Alternaria helianthi</i>	83,64 - 84,91	Dothideomycetes	
Hongo no cultivable	6, 43, 63	99,60 - 100	<i>Paraconiothyrium sp.</i>	99,59 - 100		
Hongo no cultivable	62	98,73	<i>Pyrenochaeta cava</i>	97,99		Ascomycota
<i>Epicoccum nigrum</i>	39, 40, 65, 76, 94, 95, 96	100	-	-		
Hongo no cultivable	20	97,99	<i>Phoma sp.</i>	95		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	8, 10, 45, 60, 61, 83, 97, 98	100	-	-		
Ascomycota no cultivable	19	99,57	<i>Thelebolus sp.</i>	99,54		
<i>Blumeria graminis</i>	44	100	-	-	Leotiomycetes	
<i>Podosphaera leucotricha</i>	64, 80	100	-	-		
<i>Ostropales sp.</i>	3	97,53	-	-		
Hongo no cultivable	66, 67	86,36 - 87,91	<i>Umbilicaria subglabra</i>	90,00 - 91,00	Lecanoromycetes	
Hongo no cultivable	9	94,98	<i>Rhinochadiella sp.</i>	92,89		
Hongo no cultivable	42	99,52	<i>Capronia sp.</i>	97,11	Eurotiomycetes	

Tabla S4.1 Continuación

Afiliación filogenética	Código bandas	Homología (%)	Cultivable más cercano	Homología (%)	Clase	Filo
<i>Cryptococcus no cultivable</i>	12, 14, 24, 25, 27, 29, 31, 46, 48, 50, 59, 70, 71, 92, 110, 114	100	<i>Cryptococcus sp.</i>	97,77 - 98,45		
Basidiomycota sp.	21, 22, 32	98,94 - 100	<i>Cryptococcus sp.</i>	98,00 - 98,79		
Basidiomycota no cultivable	28, 75	100	<i>Cryptococcus sp.</i>	93,71 - 99,44		
<i>Cryptococcus tephrensis</i>	58, 86	99,31	-	-		
Tremellomycetes no cultivable	100	99,49	<i>Cryptococcus chernovii</i>	99,37		
Hongo no cultivable	16, 56, 82	98,62 - 100	<i>Cryptococcus oeirensis</i>	97,98 - 100		
Basidiomycota sp.	36, 51, 54	98,60 - 100	<i>Cryptococcus macerans</i>	99,24 - 100	Tremellomycetes	
<i>Cryptococcus macerans</i>	17, 33, 34, 35, 52, 53, 55, 77, 78, 79, 81, 84, 85, 87, 88, 89	99,29 - 100	-	-		Basidiomycota
Basidiomycota no cultivable	23	99,43	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	97,83		
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	37	99,35	-	-		
<i>Kockovaella barringtoniae</i>	99	92,05	-	-		
<i>Fellomyces sp.</i>	5	99,24	-	-		
<i>Filobasidium floriforme</i>	112, 113	99,42 - 99,43	-	-		
Hongo no cultivable	1, 2, 15, 104	100	<i>Erythrobasidium clade sp.</i>	97	Cystobasidiomycetes	
<i>Rhodotorula sp.</i>	102, 103	100	-	-		
Hongo no cultivable	18	99,02	<i>Sporobolomyces sp.</i>	99	Microbotryomycetes	

Tabla S4.2 Afiliación filogenética de las bandas recuperadas de los geles de DGGE de las muestras del microbioma de la filosfera peral.

Afiliación filogenética	Código bandas	Homología (%)	Cultivable más cercano	Homología (%)	Clase	Filo
<i>Cladosporium</i> no cultivable	19, 26, 27, 60, 61, 69, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102	100	<i>Cladosporium varians</i>	100		
Pezizomycotina no cultivable	49	95,02	<i>Cladosporium perangustum</i>	94,97		
<i>Davidiella tassiana</i>	36, 37, 53, 88	98,39 - 100	-	-		
<i>Cladosporium</i> sp.	33	100	-	-		
<i>Teratosphaeria microspora</i>	46	100	-	-		
Ascomycota no cultivable	4, 76	100	<i>Teratosphaeria</i> sp.	89,64 - 89,95	Dothideomycetes	
Ascomycete sp.	17	100	<i>Xenostigmata zilleri</i>	92,7		
Ascomycota no cultivable	1, 2	100	<i>Alternaria helianthi</i>	84,11 - 84,91		
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	3, 8, 92	99,14 - 99,60	-	-		
<i>Herpotrichia parasitica</i>	20, 45	93,29 - 94,38	-	-		
<i>Lophiostoma</i> sp.	44, 50, 51	100	-	-		Ascomycota
<i>Epicoccum nigrum</i>	58, 59	100	-	-		
<i>Phoma sojicola</i>	47	100	-	-		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5, 6, 21, 23, 54, 62, 75	99,49 - 100	-	-		
<i>Blumeria graminis</i>	43, 55	100	-	-		
<i>Dasyscyphella longistipitata</i>	70, 73	89,67	-	-	Leotiomycetes	
<i>Phialophora</i> sp.	7, 22	84,29 - 84,46	-	-	Sordariomycetes	
<i>Ostropales</i> sp.	38, 39, 48, 74	96,90 - 97,67	-	-		
Hongo no cultivable	56, 57	98,10 - 98,43	<i>Umbilicaria muehlenbergii</i>	91	Lecanoromycetes	
Hongo no cultivable	16	100	<i>Umbilicaria lyngei</i>	91,11		
Hongo no cultivable	40, 52	93,30 - 94,76	<i>Rhinochlaedia</i> sp.	92,34 - 92,82	Eurotiomycetes	
Hongo no cultivable	90, 91	100	<i>Penicillium</i> sp.	90		

Tabla S4.2 continuación

Afiliación filogenética	Código bandas	Homología (%)	Cultivable más cercano	Homología (%)	Clase	Filo
<i>Cryptococcus no cultivable</i>	9, 81, 89	99,40 - 100	<i>Cryptococcus sp.</i>	97,20 - 98,45		
Basidiomycota sp.	78, 79, 80	98,58 - 100	<i>Cryptococcus sp.</i>	98,67 - 100		
Hongo no cultivable	18, 24, 29, 34	98,81 - 100	<i>Cryptococcus sp.</i>	99,32 - 100		
Tremellomycetes no cultivable	11, 12, 13, 14, 15, 28, 30, 31, 32, 35, 41, 42, 66, 67, 68, 84, 85, 86	100	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	96,91 - 97,34	Tremellomycetes	
Tremellomycetes no cultivable	77	100	<i>Cryptococcus chernovii</i>	100		Basidiomycota
Hongo no cultivable	65, 82, 83	99,47 - 100	<i>Cryptococcus oeirensis</i>	98,80 - 100		
Basidiomycota no cultivable	87	100	<i>Cryptococcus dimennae</i>	100		
<i>Cryptococcus macerans</i>	63	100	-	-		
<i>Resinicium saccharicola</i>	10	100	-	-		
Basidiomycota no cultivable	71, 72	99,20 - 100	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	100	Agaricomycetes	
Hongo no cultivable	25, 97	100	<i>Erythrobasidium clade sp.</i>	97,11 - 97,45	Cystobasidiomycetes	
Hongo no cultivable	64	100	<i>Sporobolomyces sp.</i>	99,48	Microbotryomycetes	

Tabla S4.3 Abundancia relativa, expresada en %, de los taxones fúngicos de la filosfera en cada estadio fenológico del manzano (a) y del peral (b), identificados a partir de la secuenciación de las bandas recuperadas de los perfiles de DGGE. La escala de grises está condicionadas a la abundancia relativa de cada taxón.

a)

Filo	Clase	Especie ⁺	Total	Brotación	Prefloración	Floración	Postfloración	Cuajado del fruto	Hojas
Ascomycota	Ascomycota sin clasificar	Ascomycota sin clasificar	2,059	5,824	3,386	1,894	1,446	0,030	1,241
	Dothideomycetes	<i>Aureobasidium pullulans</i>	6,892	12,208	3,996	6,880	5,317	7,915	4,623
		<i>Cladosporium cucumerinum</i>	0,596	3,299	0,000	0,065	0,101	0,000	0,560
		<i>Cladosporium</i> sp	46,170	42,386	46,647	60,019	40,776	39,060	48,111
		<i>Epicoccum nigrum</i>	1,714	0,782	2,109	2,351	2,830	0,850	1,321
		<i>Pseudocercospora humuli</i>	0,402	0,000	0,000	2,090	0,000	0,000	0,000
	Lecanoromycetes	<i>Ostropales</i> sp	2,813	7,779	2,603	3,983	2,123	0,304	1,081
	Leotiomycetes	<i>Blumeria graminis</i>	0,652	0,000	3,608	1,172	0,000	0,000	0,120
		<i>Podosphaera leucotricha</i>	0,509	0,130	0,999	0,522	0,472	0,911	0,000
	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota sin clasificar	1,971	0,000	13,149	2,380	0,135	0,000
Microbotryomycetes		<i>Rhodotorula</i>	2,854	1,217	2,331	0,813	2,797	2,384	7,925
Tremellomycetes		<i>Cryptococcus macerans</i>	16,085	13,690	8,476	10,494	15,942	37,432	2,670
		<i>Cryptococcus</i> sin clasificar	8,514	5,950	7,865	2,769	21,121	3,678	9,786
		<i>Cryptococcus tephrensis</i>	1,623	0,000	2,220	0,127	1,045	4,948	0,829
		<i>Fellomyces</i>	0,559	3,086	0,000	0,000	0,168	0,091	0,400
		<i>Filobasidium floriforme</i>	4,565	0,000	0,167	0,914	3,707	2,396	20,293
		<i>Kockovaella barringtoniae</i>	0,571	0,000	1,998	0,914	0,303	0,000	0,720
Hongos sin cultivar	Hongos sin cultivar	Hongos sin cultivar	1,451	3,651	0,444	2,612	1,719	0,000	0,320

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie se ha clasificado con el taxón más específico.

Tabla S4.3 continuación

b)

Filo	Clase	Especie	Total	Brotación	Prefloración	Floración	Postfloración	Cuajado del fruto	Hojas
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Aureobasidium pullulans</i>	8,506	3,656	6,918	9,208	22,647	4,578	2,090
		<i>Cladosporium</i> sp	36,172	27,597	33,166	32,411	20,700	47,139	64,050
		<i>Epicoccum nigrum</i>	1,810	0,000	0,705	3,734	5,835	0,000	0,000
		<i>Herpotrichia parasitica</i>	1,637	1,824	1,591	1,061	4,693	0,000	0,174
		<i>Lophiostoma</i>	1,270	0,311	2,361	4,625	0,163	0,000	0,232
		<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	1,588	0,000	8,761	0,085	0,122	0,123	1,916
	Eurotiomycetes	<i>Phialophora</i>	2,224	8,263	3,031	0,509	0,000	0,000	0,929
	Lecanoromycetes	<i>Ostropales</i> sp	5,947	0,547	0,151	9,463	12,813	10,260	0,000
	Leotiomycetes	<i>Blumeria graminis</i>	1,196	0,311	0,151	5,639	0,000	0,000	1,045
		<i>Dasyscyphella longistipitata</i>	6,436	8,524	10,030	0,000	8,234	5,408	6,874
Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Resinicium saccharicola</i>	1,130	0,454	5,604	1,188	0,082	0,000	0,000
	Basidiomycota	Basidiomycota sin clasificar	0,624	0,078	0,030	2,712	0,000	0,695	0,058
	Tremellomycetes	<i>Cryptococcus macerans</i>	1,366	0,039	0,000	0,000	7,508	0,000	0,000
		<i>Cryptococcus</i> sin clasificar	0,171	0,116	0,458	0,467	0,000	0,000	0,000
		Tremellomycetes sin clasificar	25,215	39,788	17,406	26,038	16,999	25,871	22,051
Hongos sin cultivar	Hongos sin cultivar	Hongos sin cultivar	4,709	8,492	9,637	2,860	0,204	5,927	0,581

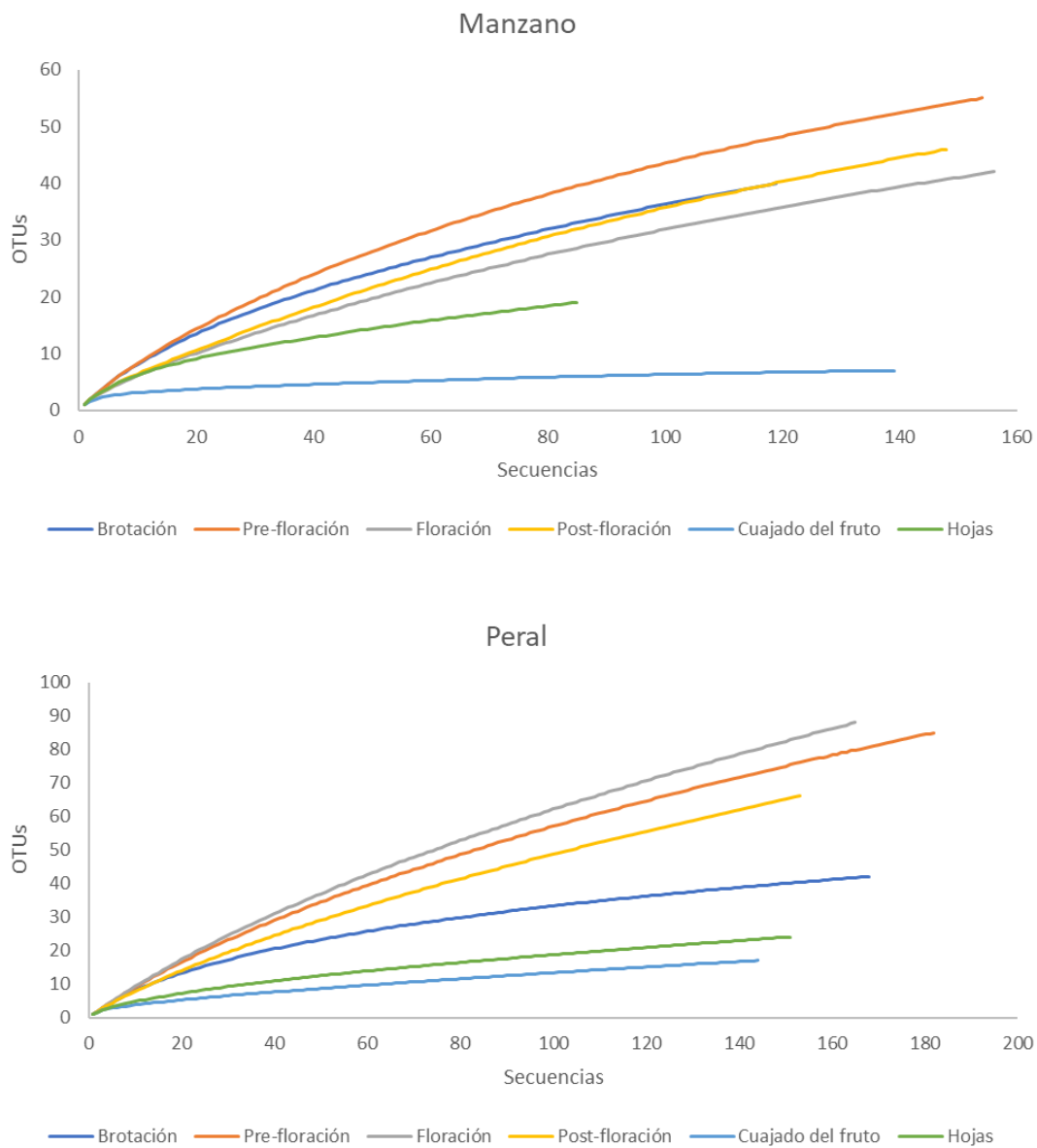


Figura S4.2 Curvas de rarefacción de las genotecas pertenecientes al bacterioma de la filosfera de manzano y peral en los diferentes estadios fenológicos. Las curvas se trazaron teniendo en cuenta un límite de 0,03 para cada muestra.

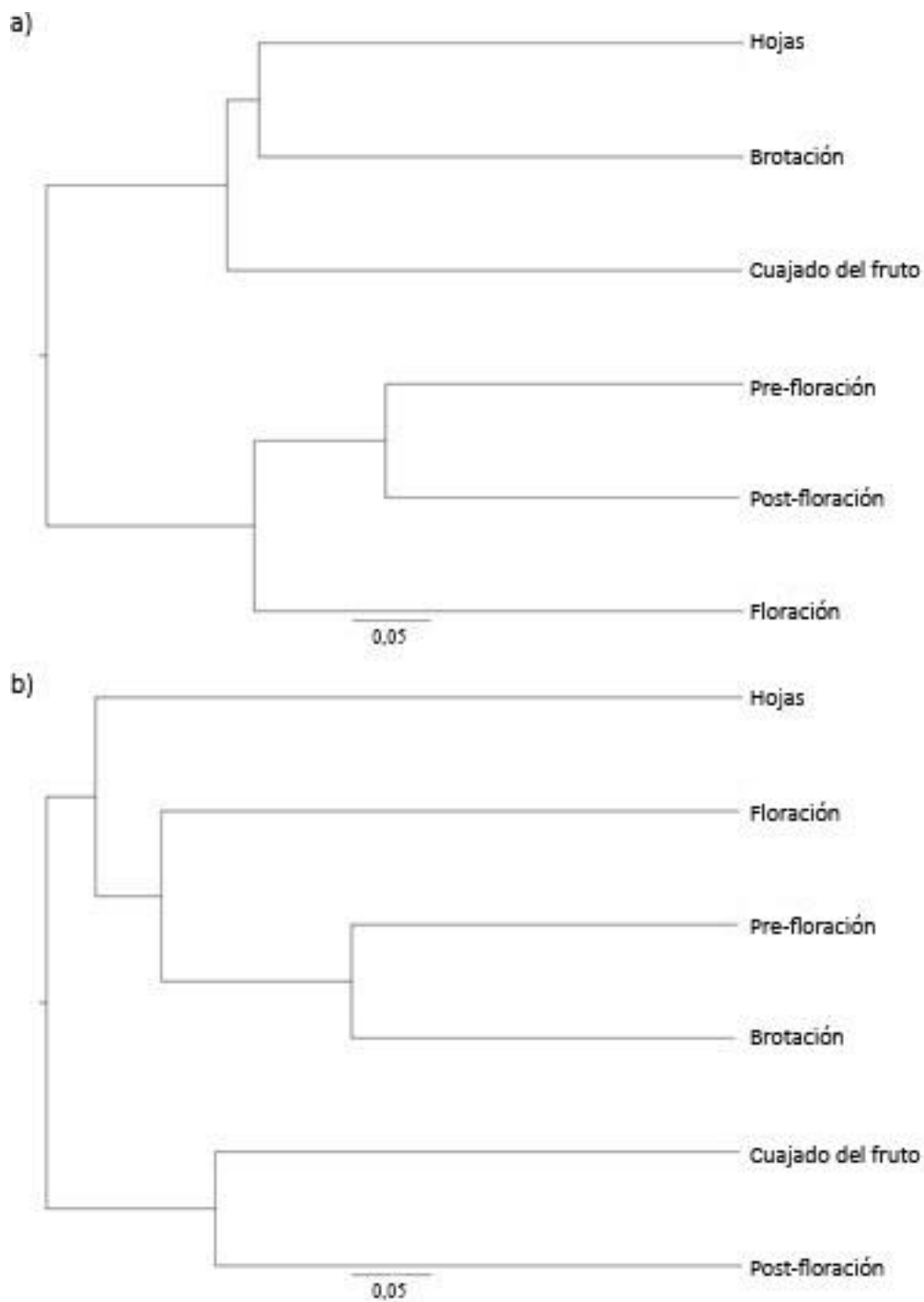


Figura S4.3 Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupaciones a partir de los resultados obtenidos a través de la elaboración de genotecas de bacterias utilizando el índice de similitud Bray-Curtis y el método de agrupación jerárquica "unweighted pair-group method" (UPGMA). La barra indica el % de similitud. a) muestras correspondientes a los diferentes estados fenológicos de manzano, b) muestras correspondientes a los diferentes estados fenológicos de peral.

Tabla S4.4 Afiliación filogenética de los 55 OTUs compartidos entre los bacteriomas de la filosfera de manzano y de peral, analizados mediante la elaboración de genotecas.

Filo	Género
Actinobacteria	Curtobacterium
	Frigoribacterium
	Rathayibacter
Bacteroidetes	Dyadobacter
	Hymenobacter
	Mucilaginibacter
	Pontibacter
	Spirosoma
Deinococcus-Thermus	Deinococcus
Firmicutes	Peptostreptococcaceae
	Acetobacteraceae
Proteobacteria	Acidovorax
	Aurantimonas
	Chelatococcus
	Citrobacter
	Ensifer
	Escherichia
	Massilia
	Mesorhizobium
	Methylobacterium
	Novosphingobium
	Pantoea
	Paracoccus
	Pectobacterium
	Pelomonas
	Polaromonas
	Pseudomonas
Rhizobium	
Roseomonas	
Sphingomonas	

Tabla S4.5 Afiliación taxonómica de los clones de la genoteca genómica del bacterioma de la filosfera en los diferentes estadios fenológicos.

a)

Filo	Género	Manzano						
		Total	B	E	F	O	Q	L
Acidobacteria	<i>Bryobacter</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Subgrupo 25	1	0	0	0	0	0	0
	Subgrupo 7	1	0	0	1	0	0	0
	Acidimicrobiales	2	0	0	0	1	0	0
	<i>Arthrobacter</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Bifidobacterium</i>	6	0	3	0	0	0	0
	<i>Clavibacter</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Curtobacterium</i>	2	1	0	0	0	0	0
	<i>Gaiellales</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Glutamicibacter</i>	1	0	0	1	0	0	0
	Intrasporangiaceae	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Leucobacter</i>	2	0	0	0	0	0	0
	Microbacteriaceae	3	0	0	0	3	0	0
	<i>Micrococcales</i>	3	0	0	0	3	0	0
	Propionibacteriales	3	0	3	0	0	0	0
	Sin cultivar	3	0	0	0	3	0	0
Armatimonadetes	Armatimonadales	1	0	0	0	0	0	0
	Fimbriimonadaceae	1	0	0	0	0	0	0
Bacterias sin clasificar	Bacteria	1	1	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Bacteroidales S24-7 grupo	1	0	0	1	0	0	0
	Bacteroidales	2	0	1	0	1	0	0
	Chitinophagaceae	11	0	2	0	0	0	0
	<i>Chryseobacterium</i>	4	0	2	0	0	0	0
	Cytophagaceae	3	0	0	2	0	0	0
	<i>Dyadobacter</i>	3	1	0	0	0	0	0
	<i>Ferruginibacter</i>	2	1	0	0	0	0	0
	Flavobacteriaceae	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Gillisia</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Hymenobacter</i>	176	25	16	9	1	0	28
	<i>Mucilaginibacter</i>	16	0	2	0	5	1	0
	<i>Pedobacter</i>	7	1	3	0	0	0	0
	<i>Pontibacter</i>	8	0	0	0	0	2	0
	Sphingobacteriaceae	23	2	1	1	0	0	0
	<i>Spirosoma</i>	28	12	1	1	1	0	0
	Sin cultivar	3	0	0	0	0	0	0
Chloroflexi	Candidatus Chlorothrix	1	0	0	0	0	0	0
	Chloroflexales	3	0	1	0	0	0	0
	<i>Chloroflexi</i>	4	0	2	0	0	0	1
	<i>Roseiflexus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	S085	5	0	0	0	0	0	0
	TK10	3	0	0	1	0	0	0
Deinococcus-Thermus	Deinococcus	50	3	2	2	2	0	5
	<i>Truepera</i>	6	1	0	1	0	0	0
FBP	FBP	4	0	0	1	1	0	0
Fibrobacteres	Sin cultivar	1	0	0	0	1	0	0

Tabla S4.5 continuación

Filo	Género	Manzano						
		Total	B	E	F	O	Q	L
Firmicutes	<i>Aerosphaera</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Bacillaceae	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacillus</i>	2	1	1	0	0	0	0
	Clostridiaceae 1	5	0	2	0	0	0	0
	<i>Clostridium</i>	27	0	1	0	0	0	0
	<i>Fastidiosipila</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Lachnospiraceae	2	0	1	0	0	0	0
	Lactobacillales	4	0	1	2	1	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Paenibacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Paraclostridium	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Planococcus</i>	2	0	0	2	0	0	0
	Ruminiclostridium 1	1	0	0	0	0	0	0
	Ruminococcaceae UCG-002	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Sporolactobacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Streptococcus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Terrisporobacter</i>	14	0	1	2	2	0	2
	<i>Tumebacillus</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Turicibacter</i>	3	0	0	0	3	0	0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadaceae	5	0	0	0	1	0	0
	<i>Gemmatimonas</i>	4	0	2	0	1	0	0
	S0134 terrestrial group	1	0	0	0	0	0	0
	Sin cultivar	2	2	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Acetobacteraceae	12	0	0	0	0	0	0
	<i>Acidiphilium</i>	3	1	2	0	0	0	0
	<i>Acinetobacter</i>	4	4	0	0	0	0	0
	Alcalinaceae	1	0	0	0	0	0	0
	Alphaproteobacteria	2	0	0	0	1	0	0
	<i>Amaricoccus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Archangiaceae	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Arenimonas</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Bartonella</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Bdellovibrio</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Betaproteobacteria	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Brevundimonas</i>	2	0	2	0	0	0	0
	<i>Buchnera</i>	18	0	0	16	2	0	0
	Candidatus Alysiosphaera	3	0	0	0	2	0	0
	<i>Chelatococcus</i>	1	1	0	0	0	0	0
	Comamonadaceae	43	13	0	1	2	0	0
	<i>Cupriavidus</i>	4	0	4	0	0	0	0
	Deltaproteobacteria	2	0	1	0	0	0	0
	<i>Devosia</i>	3	0	0	0	0	0	0
	Endosimbionte 3	2	0	0	0	2	0	0
	<i>Enterobacter</i>	28	0	0	3	0	4	0
	Enterobacteriaceae	31	1	4	0	0	0	1
	<i>Erwinia</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia</i>	25	3	5	1	0	0	0
	Gammaproteobacteria	6	0	0	2	0	0	0

Tabla S4.5 continuación

Filo	Género	Manzano						
		Total	B	E	F	O	Q	L
	<i>Haliangium</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Hydronophaga</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Ignatzschineria</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Lysobacter</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Massilia</i>	33	4	0	2	1	0	2
	<i>Methylobacterium</i>	239	10	46	5	5	0	31
	Methylocystaceae	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Microvirga</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Myxococcales	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Nitrosomonas</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Novosphingobium</i>	8	0	0	0	0	0	0
	<i>Ochrobactrum</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Oxalobacteraceae	5	0	5	0	0	0	0
	<i>Pantoea</i>	189	0	0	7	36	74	0
	<i>Paracoccus</i>	6	0	0	0	0	0	0
	Pasteurellaceae	2	0	0	0	0	0	0
	Phyllobacteriaceae	2	0	0	2	0	0	0
	<i>Polaromonas</i>	2	1	0	0	0	0	0
	<i>Pseudochrobactrum</i>	1	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	257	0	3	70	43	43	0
	<i>Psychrobacter</i>	5	0	0	0	0	0	0
	<i>Reyranella</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Rhizobiaceae	9	1	0	1	0	0	0
	Rhizobiales	28	1	4	0	5	0	1
	<i>Rhizobium</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Rhizomicrobium</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Rhodobacteraceae	14	1	1	2	2	1	0
	Rhodospirillales	3	0	0	0	0	0	1
	<i>Rickettsia</i>	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Roseomonas</i>	17	2	3	2	1	0	0
	<i>SC-I-84</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Serratia</i>	14	0	0	0	0	0	0
	<i>Sphingobium</i>	7	1	0	2	2	0	0
	Sphingomonadaceae	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Sphingomonas</i>	198	20	16	11	11	14	13
	<i>Sphingopyxis</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Stenotrophomonas</i>	2	0	2	0	0	0	0
	Sin cultivar	3	0	2	0	1	0	0
	Xanthobacteraceae	6	1	0	0	0	0	0
Saccharibacteria	Saccharibacteria	4	1	0	0	0	0	0
Verrucomicrobia	<i>WCHB1-41</i>	1	0	0	0	0	0	0

^B: brotación, E: prefloración, F: floración, O: postfloración, Q: cuajado del fruto, L: maduración del fruto.

+ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género, se ha clasificado con el taxón más específico.

Tabla S4.5 continuación

b)

Filo	Género	Peral						
		Total	B	E	F	O	Q	L
Acidobacteria	<i>Bryobacter</i>	1	0	0	1	0	0	0
	Subgrupo 25	1	0	0	1	0	0	0
	Subgrupo 7	1	0	0	0	0	0	0
	Acidimicrobiales	2	0	0	1	0	0	0
	<i>Arthrobacter</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Bifidobacterium</i>	6	1	2	0	0	0	0
	<i>Clavibacter</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Curtobacterium</i>	2	1	0	0	0	0	0
	<i>Gaiellales</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Glutamicibacter</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Intrasporangiaceae	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Leucobacter</i>	2	0	0	0	1	0	1
	Microbacteriaceae	3	0	0	0	0	0	0
	<i>Micrococcales</i>	3	0	0	0	0	0	0
	Propionibacteriales	3	0	0	0	0	0	0
	Sin cultivar	3	0	0	0	0	0	0
Armatimonadetes	Armatimonadales	1	0	0	1	0	0	0
	Fimbriimonadaceae	1	0	0	0	0	0	1
Bacterias sin clasificar	Bacteria	1	0	0	0	0	0	0
Bacteroidetes	Bacteroidales S24-7 grupo	1	0	0	0	0	0	0
	Bacteroidales	2	0	0	0	0	0	0
	Chitinophagaceae	11	0	1	5	2	0	1
	<i>Chryseobacterium</i>	4	1	0	1	0	0	0
	Cytophagaceae	3	0	0	1	0	0	0
	<i>Dyadobacter</i>	3	0	1	1	0	0	0
	<i>Ferruginibacter</i>	2	0	0	0	0	0	1
	Flavobacteriaceae	1	0	0	0	0	0	1
	<i>Gillisia</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Hymenobacter</i>	176	38	23	15	7	5	9
	<i>Mucilaginibacter</i>	16	3	1	4	0	0	0
	<i>Pedobacter</i>	7	0	0	1	1	0	1
	<i>Pontibacter</i>	8	1	4	0	1	0	0
	Sphingobacteriaceae	23	10	4	3	2	0	0
	<i>Spirosoma</i>	28	4	7	2	0	0	0
	Sin cultivar	3	0	0	3	0	0	0
	Chloroflexi	Candidatus Chlorothrix	1	0	0	0	1	0
Chloroflexales		3	0	1	0	1	0	0
<i>Chloroflexi</i>		4	0	0	1	0	0	0
<i>Roseiflexus</i>		1	0	0	1	0	0	0
<i>S085</i>		5	1	1	1	0	2	0
<i>TK10</i>		3	1	0	1	0	0	0
Deinococcus-Thermus	Deinococcus	50	9	9	12	5	0	1
	<i>Truepera</i>	6	0	0	1	1	1	1
FBP	FBP	4	0	0	1	1	0	0
Fibrobacteres	Sin cultivar	1	0	0	0	0	0	0

Tabla S4.5 continuación

Tabla S4.5 continuación

Filo	Género	Peral						
		Total	B	E	F	O	Q	L
Firmicutes	<i>Aerosphaera</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Bacillaceae	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Bacillus</i>	2	0	0	0	0	0	0
	Clostridiaceae 1	5	0	0	1	1	1	0
	<i>Clostridium</i>	27	0	1	11	14	0	0
	<i>Fastidiosipila</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Lachnospiraceae	2	0	1	0	0	0	0
	Lactobacillales	4	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Paenibacillus</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Paraclostridium	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Planococcus</i>	2	0	0	0	0	0	0
	Ruminiclostridium 1	1	0	1	0	0	0	0
	Ruminococcaceae UCG-002	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Sporolactobacillus</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Streptococcus</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Terrisporobacter</i>	14	0	3	1	0	0	3
	<i>Tumebacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Turicibacter</i>	3	0	0	0	0	0	0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadaceae	5	0	0	1	1	1	1
	<i>Gemmatimonas</i>	4	0	1	0	0	0	0
	S0134 terrestrial group	1	0	0	0	1	0	0
	Sin cultivar	2	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Acetobacteraceae	12	1	1	2	8	0	0
	<i>Acidiphilium</i>	3	0	0	0	0	0	0
	<i>Acinetobacter</i>	4	0	0	0	0	0	0
	Alcalinaceae	1	0	0	1	0	0	0
	Alphaproteobacteria	2	0	0	1	0	0	0
	<i>Amaricoccus</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Archangiaceae	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Arenimonas</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Bartonella</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Bdellovibrio</i>	1	0	0	0	0	1	0
	Betaproteobacteria	2	0	2	0	0	0	0
	<i>Brevundimonas</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Buchnera</i>	18	0	0	0	0	0	0
	Candidatus Alysiosphaera	3	0	1	0	0	0	0
	<i>Chelatococcus</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Comamonadaceae	43	15	7	4	1	0	0
	<i>Cupriavidus</i>	4	0	0	0	0	0	0
	Deltaproteobacteria	2	0	1	0	0	0	0
	<i>Devosia</i>	3	0	3	0	0	0	0
	Endosimbionte 3	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Enterobacter</i>	28	0	1	4	4	12	0
	Enterobacteriaceae	31	5	9	6	4	0	1
	<i>Erwinia</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia</i>	25	6	2	7	1	0	0
	Gammaaproteobacteria	6	0	0	0	4	0	0

Tabla S4.5 continuación

Filo	Género	Peral						
		Total	B	E	F	O	Q	L
Proteobacteria	<i>Haliangium</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Hydronephaga</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Ignatzschineria</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Lysobacter</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Massilia</i>	33	9	8	4	2	0	1
	<i>Methylobacterium</i>	239	23	11	9	7	1	91
	Methylocystaceae	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Microvirga</i>	1	0	0	1	0	0	0
	Myxococcales	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Nitrosomonas</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Novosphingobium</i>	8	1	6	0	1	0	0
	<i>Ochrobactrum</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Oxalobacteraceae	5	0	0	0	0	0	0
	<i>Pantoea</i>	189	0	3	0	2	67	0
	<i>Paracoccus</i>	6	0	1	1	4	0	0
	Pasteurellaceae	2	0	0	0	0	2	0
	Phyllobacteriaceae	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Polaromonas</i>	2	1	0	0	0	0	0
	<i>Pseudochrobactrum</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas</i>	257	2	5	2	41	48	0
	<i>Psychrobacter</i>	5	0	2	0	3	0	0
	<i>Reyranella</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Rhizobiaceae	9	1	4	0	2	0	0
	Rhizobiales	28	0	3	14	0	0	0
	<i>Rhizobium</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Rhizomicrobium</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Rhodobacteraceae	14	1	2	2	2	0	0
	Rhodospirillales	3	0	0	0	1	0	1
	<i>Rickettsia</i>	6	0	1	0	1	0	4
	<i>Roseomonas</i>	17	1	5	3	0	0	0
	<i>SC-I-84</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Serratia</i>	14	7	2	2	3	0	0
	<i>Sphingobium</i>	7	0	0	1	0	1	0
	Sphingomonadaceae	2	0	0	0	2	0	0
	<i>Sphingomonas</i>	198	23	30	16	10	2	32
	<i>Sphingopyxis</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Stenotrophomonas</i>	2	0	0	0	0	0	0
	Sin cultivar	3	0	0	0	0	0	0
	Xanthobacteraceae	6	0	1	3	1	0	0
	Saccharibacteria	Saccharibacteria	4	1	2	0	0	0
Verrucomicrobia	<i>WCHB1-41</i>	1	1	0	0	0	0	

^B: brotación, E: prefloración, F: floración, O: postfloración, Q: cuajado del fruto, L: maduración del fruto.

+ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género, se ha clasificado con el taxón más específico.

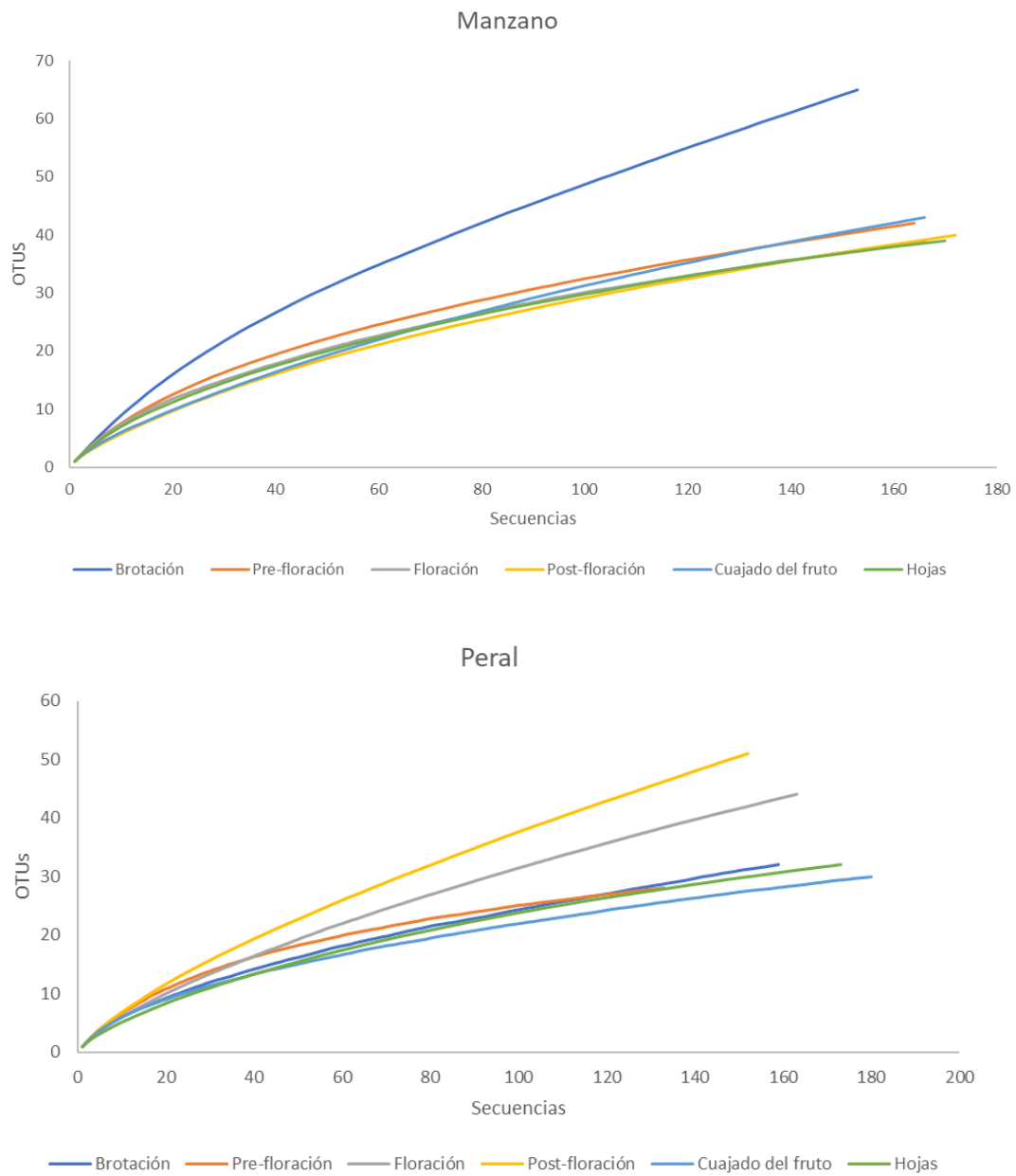


Figura S4.4 Curvas de rarefacción de las genotecas pertenientes al microbioma de la filosfera de manzano y peral en los diferentes estadios fenológicos analizados. Las curvas se trazaron teniendo en cuenta un límite de 0,03 para cada muestra.

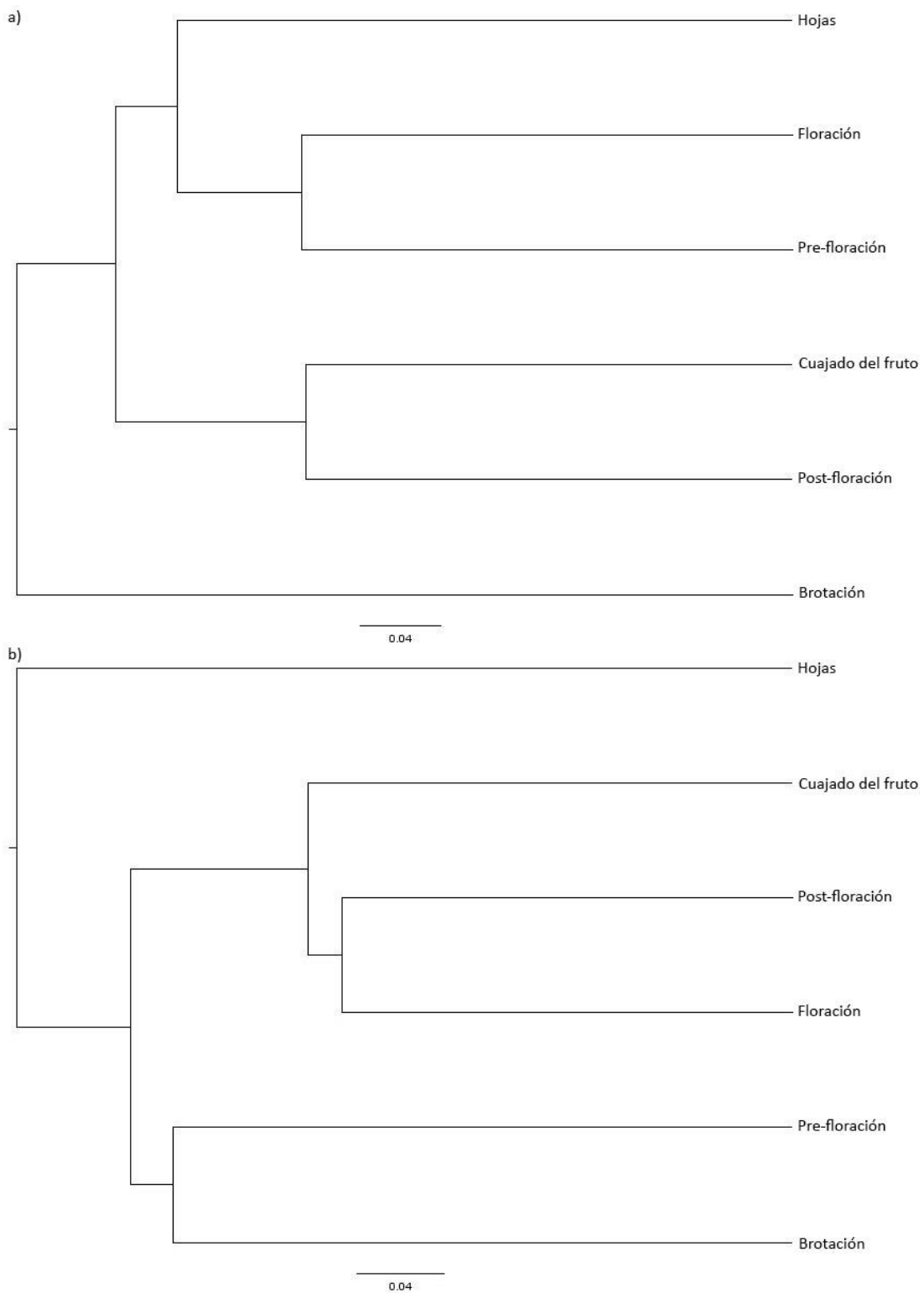


Figura S4.5 Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupaciones a partir de los resultados obtenidos a través de la elaboración de las genotecas de hongos, utilizando el índice de similitud Bray-Curtis y el método de agrupación jerárquica "unweighted pair-group method" (UPGMA). La barra indica el % de similitud. a) muestras correspondientes a los diferentes estados fenológicos de manzano, b) muestras correspondientes a los diferentes estados fenológicos de peral

Tabla S4.6 Afiliación filogenética de los 43 OTUs compartidos entre los micobiotas de la filosfera de manzano y peral, analizados mediante la elaboración de genotecas.

Filo	Especie⁺
Ascomycota	<i>Alternaria sp</i>
	<i>Aureobasidium proteae</i>
	<i>Blumeria sp</i>
	<i>Capnodiales sp</i>
	<i>Cladosporium aggregatocicatricatum</i>
	<i>Cladosporium sp</i>
	<i>Dothideomycetes sp</i>
	<i>Golovinomyces orontii</i>
	<i>Lachnum sp</i>
	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>
	Ostropales
	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>
	Pleosporales
	Sclerotiniaceae
<i>Tumularia sp</i>	
Basidiomycota	<i>Cystofilobasidium macerans</i>
	<i>Dioszegia hungarica</i>
	<i>Filobasidium sp</i>
	<i>Golubevia sp</i>
	<i>Holtermanniella sp</i>
	Sporidiobolaceae
	<i>Symmetrospora coprosmae</i>
	<i>Symmetrospora sp</i>
	<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>
	<i>Udeniomyces pyricola</i>
	<i>Vishniacozyma sp</i>
	<i>Vishniacozyma carnescens</i>
	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>
<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>	
Hongo no clasificado	Hongo no clasificado

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie, se ha clasificado con el taxón más específico

Tabla S4.7 Clones fúngicos asociados a cada filo pertenecientes a la filosfera de manzano y peral, totales y en cada estado fenológico analizado, obtenidos a partir de la elaboración de genotecas.

Filo	Manzano [^]						
	Total	B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	1329	107	101	108	130	110	97
Basidiomycota	570	43	63	58	39	49	67
Hongos sin clasificar	52	3	0	0	3	7	6

Filo	Peral [^]						
	Total	B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	1329	77	102	127	122	107	141
Basidiomycota	570	72	25	32	29	68	25
Hongos sin clasificar	52	10	6	4	1	5	7

[^]B: brotación, E: prefloración, F: floración, O: postfloración, Q: cuajado del fruto, L: maduración del fruto.

Tabla S4.8 Número de clones fúngicos asociados a cada especie pertenecientes a la filosfera de peral, totales y en los diferentes estadios fenológicos, obtenidos mediante la elaboración de lgenotecas.

a)

Filo	Género	Manzano						
		Total	B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	<i>Alloleptosphaeria italica</i>	2	2	0	0	0	0	0
	<i>Alternaria sesami</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Alternaria sp</i>	141	12	22	9	7	9	28
	<i>Angustimassarina sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Arthrinium marii</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Ascochyta medicaginicola</i> var. <i>medicaginicola</i>	1	0	0	0	0	1	0
	Ascomycota	15	2	1	0	2	0	1
	<i>Aureobasidium proteae</i>	44	2	1	10	1	1	1
	<i>Aureobasidium sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Bacidia chlorotricula</i>	3	0	0	0	0	0	0
	<i>Bipolaris cynodontis</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Blumeria sp</i>	7	0	0	6	0	0	0
	<i>Brunnipila dumorum</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Capnodiales	29	0	0	2	5	12	1
	<i>Chaetasbolisia longiseta</i>	1	1	0	0	0	0	0
	Chaetothyriales	1	0	0	0	0	0	0
	Cladosporiaceae	2	0	0	0	1	0	1
	<i>Cladosporium aggregatocaticatricatum</i>	10	0	2	0	0	0	0
	<i>Cladosporium laxicapitulatum</i>	1	0	0	0	0	1	0
	<i>Cladosporium sp</i>	653	13	20	38	85	71	44
	<i>Cyphellophora gamsii</i>	13	1	0	0	0	0	0
	Didymellaceae	6	0	1	0	0	1	0
	Didymosphaeriaceae	2	1	0	0	0	0	0
	<i>Diutina catenulata</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Dothideomyces sp</i>	128	3	13	11	17	9	12
	<i>Golovinomyces orontii</i>	2	0	1	0	0	0	0

Tabla S4.8 continuación

Filo	Género	Total	Manzano					
			B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	Helotiales	2	1	0	0	0	0	0
	<i>Herpotrichia parasitica</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Knufia sp</i>	2	2	0	0	0	0	0
	<i>Lachnum sp</i>	3	0	1	0	0	0	0
	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	33	15	8	4	1	0	1
	<i>Leptospora sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Lithophila guttulata</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Lophiostoma sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Mycosphaerellaceae	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Naevala sp</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Neocatenulostroma germanicum</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Neocatenulostroma sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Neoerysiphe nevoi</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Neosetophoma clematidis</i>	19	9	3	3	2	0	2
	<i>Neosetophoma sp</i>	10	10	0	0	0	0	0
	<i>Nigrospora oryzae</i>	1	0	0	1	0	0	0
	Ostropales	24	5	1	0	0	0	0
	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	51	2	5	3	0	0	4
	<i>Paraphoma sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Parathyridaria robiniae</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Periconia byssoides</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Phaeococcomyces mexicanus</i>	2	0	0	1	1	0	0
	<i>Phaeococcomyces sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Phaeosphaeria microscopica</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Phaeosphaeria sp</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Phaeosphaeriaceae	3	1	1	0	1	0	0
	<i>Phaeothecoidea proteae</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Phialophora livistonae</i>	2	0	2	0	0	0	0
	<i>Phoma aloes</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Pleosporaceae	2	0	0	0	0	0	0
	Pleosporales	16	5	4	0	2	1	0
	<i>Podosphaera leucotricha</i>	1	0	0	0	0	1	0
	<i>Podosphaera sp</i>	2	0	2	0	0	0	0
	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Pyrenochaeta cava</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Pyrenophora lolii</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Rachicladosporium cboliae</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Ramularia sp</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Sclerostagonospora cycadis</i>	13	8	4	1	0	0	0
	Sclerotiniaceae	3	0	0	0	1	0	0
	<i>Stemphylium sp</i>	11	0	2	2	4	3	0
	<i>Taeniolella stilbospora</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Taphrina rhizophora</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Taphrinomycetes	1	0	0	0	0	0	0
	Teratosphaeriaceae	2	0	0	2	0	0	0
	<i>Trullula melanochlora</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Tumularia sp</i>	26	4	4	11	0	0	2

Tabla S4.8 continuación

Filo	Género	Total	Manzano					
			B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	<i>Ulocladium sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Zymoseptoria sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
Basidiomycota	Agaricostilbomycetes	3	2	0	0	0	0	1
	Agaricostilbomycetes	1	1	0	0	0	0	0
	Basidiomycota	8	0	0	0	1	1	2
	<i>Bjerkandera adusta</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	1	0	1	0	0	0	0
	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	10	1	1	1	2	4	0
	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Dioszegia hungarica</i>	4	0	1	0	0	2	0
	<i>Entyloma sp</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Entylomatales	3	0	0	0	0	0	0
	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Erythrobasidium sp</i>	3	1	0	0	0	0	2
	<i>Filobasidium floriforme</i>	3	0	0	0	0	0	3
	<i>Filobasidium oeirensense</i>	14	0	0	2	0	0	11
	<i>Filobasidium sp</i>	18	0	0	0	1	0	11
	<i>Golubevia sp</i>	14	0	0	0	0	0	1
	Holtermanniales	1	0	0	0	0	1	0
	<i>Holtermanniella sp</i>	2	0	0	0	0	1	0
	<i>Kalmanozyma fusiformata</i>	101	15	33	19	12	0	22
	<i>Leucosporidium fragarium</i>	2	0	1	1	0	0	0
	<i>Leucosporidium golubevii</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Leucosporidium sp</i>	1	1	0	0	0	0	0
	<i>Meira argovae</i>	1	0	0	0	0	0	1
	<i>Melampsora sp</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Microbotryomycetes	3	0	1	2	0	0	0
	<i>Microstroma sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Papiliotrema sp</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Rhodotorula babjevae</i>	8	1	2	1	0	0	4
	<i>Rhodotorula sp</i>	1	0	0	0	0	0	1
	<i>Septobasidium sp</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Sporidiobolaceae	39	0	4	0	6	0	0
	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	2	0	1	0	0	0	0
	<i>Stereum hirsutum</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Symmetrospora coprosmae</i>	5	0	0	1	0	0	0	
<i>Symmetrospora sp</i>	11	1	0	0	0	0	2	
<i>Tausonia pullulans</i>	1	0	0	0	0	0	0	
<i>Tilletiopsis sp</i>	1	0	0	0	0	0	0	
<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	7	0	1	3	0	0	1	
<i>Trametes trogii</i>	2	0	0	0	0	0	0	
<i>Tremellales sp</i>	1	0	0	0	0	0	0	
Tremellomycetes	7	0	0	0	0	7	0	

Tabla S4.8 continuación

Filo	Género	Total	Manzano					L
			B	E	F	O	Q	
Basidiomycota	<i>Udeniomyces pseudopyricola</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Udeniomyces pyricola</i>	7	0	3	0	3	0	0
	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	23	2	0	2	0	0	0
	<i>Vishniacozyma globispora</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	5	0	1	0	0	0	0
	<i>Vishniacozyma sp</i>	143	10	10	22	11	33	5
	<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>	95	1	0	2	3	0	0
	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	5	5	0	0	0	0	0
	<i>Vuilleminia comedens</i>	1	0	0	0	0	0	0
Hongos sin clasificar	Hongos sin clasificar	52	3	0	0	3	7	6

b)

Filo	Género	Total	Peral					L
			B	E	F	O	Q	
Ascomycota	<i>Alloleptosphaeria italica</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Alternaria sesami</i>	1	0	0	0	0	0	1
	<i>Alternaria sp</i>	141	1	4	8	20	6	15
	<i>Angustimassarina sp</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Arthrinium marii</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Ascochyta medicaginicola</i> var. <i>medicaginicola</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Ascomycota	15	1	0	3	5	0	0
	<i>Aureobasidium proteae</i>	44	17	3	0	4	3	1
	<i>Aureobasidium sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Bacidia chlorotricula</i>	3	0	0	0	3	0	0
	<i>Bipolaris cynodontis</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Blumeria sp</i>	7	0	0	1	0	0	0
	<i>Brunnipila dumorum</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Capnodiales	29	0	4	0	2	2	1
	<i>Chaetasbolisia longiseta</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Chaetothyriales	1	1	0	0	0	0	0
	Cladosporiaceae	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Cladosporium aggregatocicatricatum</i>	10	0	1	2	0	2	3
	<i>Cladosporium laxicapitulatum</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Cladosporium sp</i>	653	48	39	71	53	76	95
	<i>Cyphellophora gamsii</i>	13	5	3	2	2	0	0
	Didymellaceae	6	0	0	3	1	0	0
	Didymosphaeriaceae	2	0	1	0	0	0	0
	<i>Dutina catenulata</i>	2	0	0	0	0	0	2
	<i>Dothideomyces sp</i>	128	1	7	18	16	14	7
	<i>Golovinomyces orontii</i>	2	0	0	1	0	0	0
	Helotiales	2	0	0	0	1	0	0

Tabla S4.8 continuación

Filo	Género	Total	Peral					L
			B	E	F	O	Q	
Ascomycota	<i>Herpotrichia parasitica</i>	2	0	0	1	1	0	0
	<i>Knufia sp</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Lachnum sp</i>	3	0	0	1	0	1	0
	<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	33	1	3	0	0	0	0
	<i>Leptospora sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Lithophila guttulata</i>	2	0	0	2	0	0	0
	<i>Lophiostoma sp</i>	1	0	1	0	0	0	0
	Mycosphaerellaceae	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Naevala sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Neocatenulostroma germanicum</i>	2	0	0	0	2	0	0
	<i>Neocatenulostroma sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Neoerysiphe nevoi</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Neosetophoma clematidis</i>	19	0	0	0	0	0	0
	<i>Neosetophoma sp</i>	10	0	0	0	0	0	0
	<i>Nigrospora oryzae</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Ostropales	24	0	8	9	1	0	0
	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	51	1	24	0	1	1	10
	<i>Paraphoma sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Parathyridaria robiniae</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Periconia byssoides</i>	1	0	0	0	0	1	0
	<i>Phaeococcomyces mexicanus</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Phaeococcomyces sp</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Phaeosphaeria microscopica</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Phaeosphaeria sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Phaeosphaeriaceae	3	0	0	0	0	0	0
	<i>Phaeothecoidea proteae</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Phialophora livistonae</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Phoma aloes</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Pleosporaceae	2	0	0	1	0	0	1
	Pleosporales	16	0	0	0	1	0	3
	<i>Podosphaera leucotricha</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Podosphaera sp</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Pyrenochaeta cava</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Pyrenophora lolii</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Rachicladosporium cboliae</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Ramularia sp</i>	2	0	0	0	0	0	2
	<i>Sclerostagonospora cycadis</i>	13	0	0	0	0	0	0
	Sclerotiniaceae	3	0	0	1	0	1	0

Tabla S4.8 continuación

Filo	Género	Total	Peral					
			B	E	F	O	Q	L
Ascomycota	<i>Stemphylium sp</i>	11	0	0	0	0	0	0
	<i>Taeniolella stilbospora</i>	1	0	0	0	1	0	0
	<i>Taphrina rhizophora</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Taphrinomycetes	1	0	0	0	1	0	0
	Teratosphaeriaceae	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Trullula melanochlora</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Tumularia sp</i>	26	1	4	0	0	0	0
	<i>Ulocladium sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Zymoseptoria sp</i>	1	0	0	0	0	0	0
	Basidiomycota	Agaricostilbomycetes	3	0	0	0	0	0
Agaricostilbomycetes		1	0	0	0	0	0	0
Basidiomycota		8	1	0	3	0	0	0
<i>Bjerkandera adusta</i>		1	0	0	1	0	0	0
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Cystofilobasidium macerans</i>		10	0	0	0	0	1	0
<i>Daedaleopsis confragosa</i>		1	0	0	0	1	0	0
<i>Dioszegia hungarica</i>		4	0	0	0	0	1	0
<i>Entyloma sp</i>		1	0	0	0	0	0	0
Entylomatales		3	0	0	0	0	0	3
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Erythrobasidium sp</i>		3	0	0	0	0	0	0
<i>Filobasidium floriforme</i>		3	0	0	0	0	0	0
<i>Filobasidium oeirense</i>		14	0	0	1	0	0	0
<i>Filobasidium sp</i>		18	2	0	0	1	3	0
<i>Golubevia sp</i>		14	0	0	0	0	0	13
Holtermanniales		1	0	0	0	0	0	0
<i>Holtermanniella sp</i>		2	0	0	0	1	0	0
<i>Kalmanozyma fusiformata</i>		101	0	0	0	0	0	0
<i>Leucosporidium fragarium</i>		2	0	0	0	0	0	0
<i>Leucosporidium golubevii</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Leucosporidium sp</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Meira argovae</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Melampsora sp</i>		1	0	0	0	0	0	0
Microbotryomycetes		3	0	0	0	0	0	0
<i>Microstroma sp</i>		1	2	0	0	0	0	0
<i>Papiliotrema sp</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula babjevae</i>		8	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula sp</i>		1	0	0	0	0	0	0
<i>Septobasidium sp</i>		1	0	0	0	0	0	0
Sporidiobolaceae		39	0	0	2	0	27	0

Tabla S4.8 continuación

Filo	Género	Total	Peral					
			B	E	F	O	Q	L
Basidiomycota	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	2	0	0	1	0	0	0
	<i>Stereum hirsutum</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Symmetrospora coprosmae</i>	5	4	0	0	0	0	0
	<i>Symmetrospora sp</i>	11	0	1	0	1	0	6
	<i>Tausonia pullulans</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Tilletiopsis sp</i>	1	0	0	0	0	0	1
	<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>	7	0	0	1	0	0	1
	<i>Trametes trogii</i>	2	0	2	0	0	0	0
	<i>Tremellales sp</i>	1	0	0	0	1	0	0
	Tremellomycetes	7	0	0	0	0	0	0
	<i>Udeniomyces pseudopyricola</i>	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Udeniomyces pyricola</i>	7	0	0	1	0	0	0
	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	23	8	3	2	3	3	0
	<i>Vishniacozyma globispora</i>	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	5	4	0	0	0	0	0
	<i>Vishniacozyma sp</i>	143	9	4	5	10	24	0
	<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>	95	41	15	12	11	9	1
	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	5	0	0	0	0	0	0
	<i>Vuilleminia comedens</i>	1	1	0	0	0	0	0
	Hongos sin clasificar	Hongos sin clasificar	52	10	6	4	1	5

^B: brotación, E: prefloración, F: floración, O: postfloración, Q: cuajado del fruto, L: maduración del fruto.

* en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie, se ha clasificado con el taxón más específico

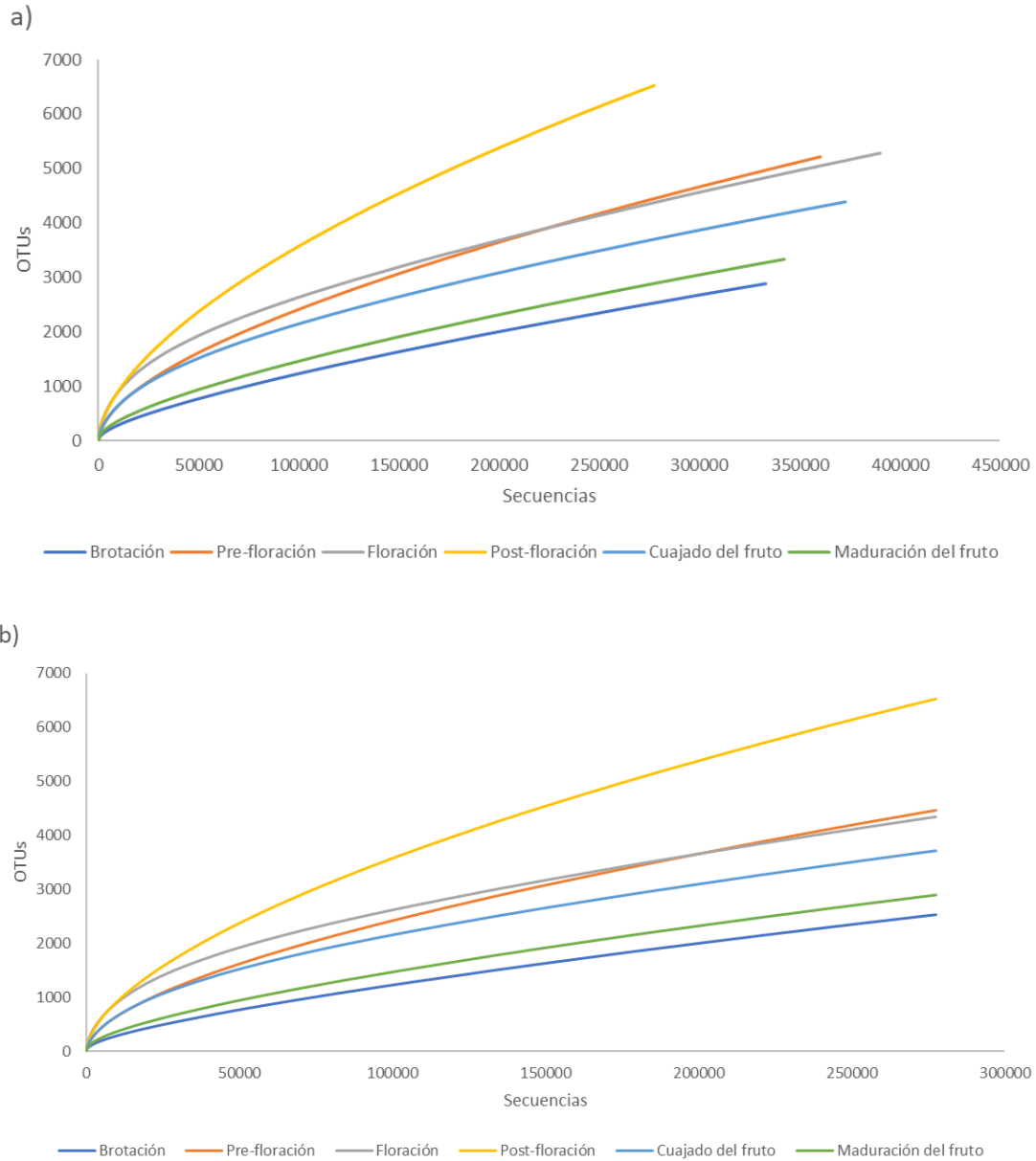


Figura S4.6 Curvas de rarefacción de las muestras del bacterioma de la filosfera de peral pertenecientes a los 6 estadios fenológicos del árbol, analizadas mediante Illumina Miseq. a) basadas en el número total de secuencias. b) a partir del subgrupo de secuencias, seleccionado al azar, que se utilizará para determinar la β -diversidad. Las curvas se trazaron teniendo en cuenta un límite de 0,03 para cada muestra.

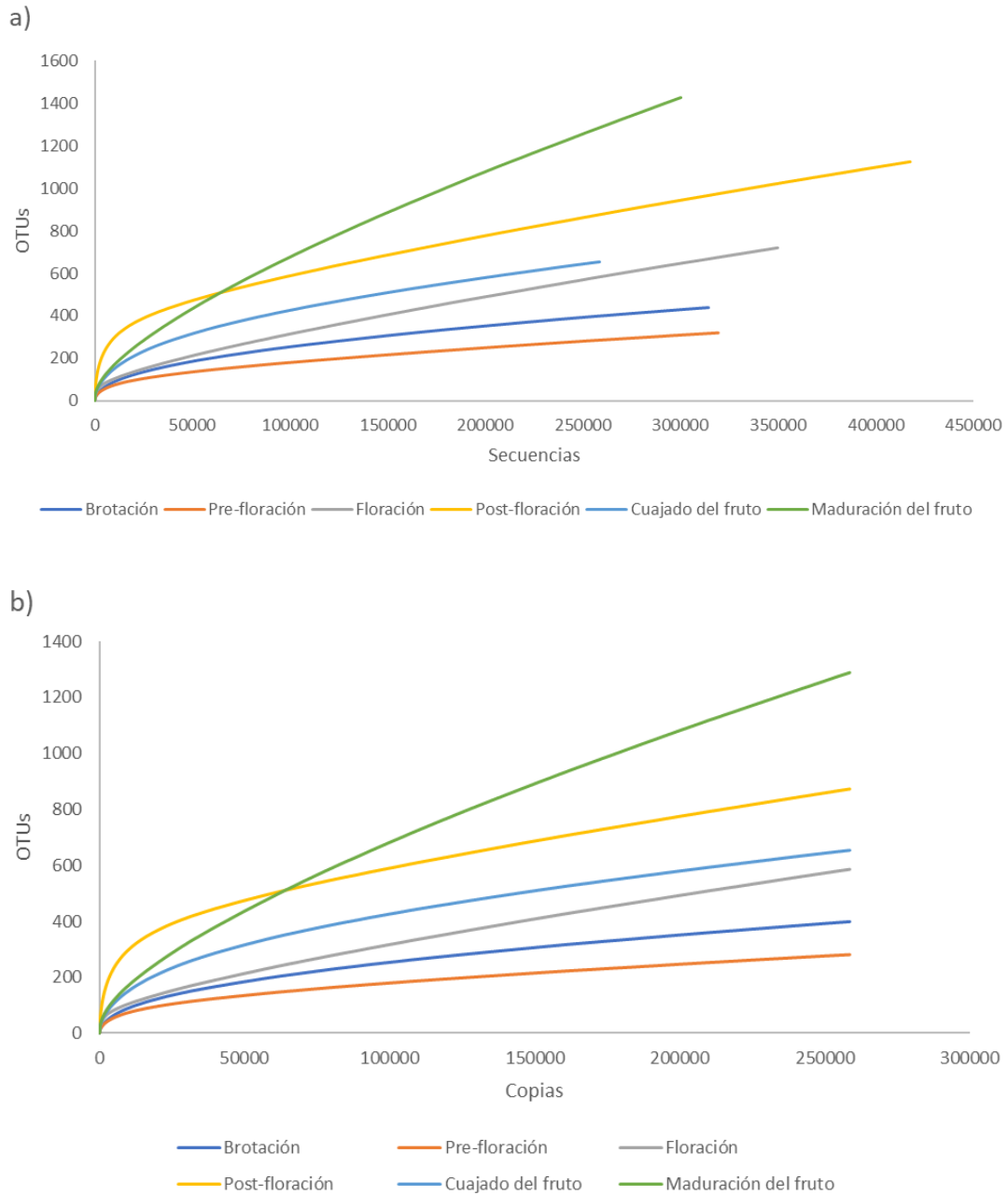


Figura S4.7 Curvas de rarefacción de las muestras del microbioma de la filofera de peral pertenecientes a los 6 estadios fenológicos del árbol, analizadas mediante Illumina Miseq. a) basadas en el número total de secuencias. b) a partir del subgrupo de secuencias, seleccionado al azar, que se utilizará para determinar la β -diversidad. Las curvas se trazaron teniendo en cuenta un límite de 0,03 para cada muestra.

10.3 Anexo suplementario capítulo 5

Tabla S5.1 Afiliación filogenética de las bandas recuperadas y secuenciadas a partir de los perfiles de DGGE de hongos (Figura 5.2).

Banda	Longitud (bp)	Afiliación taxonómica (Filo, Clase, Orden, Familia, Género)	Mayor e-Value Blast (accession no.)	% similitud
A.1	240	Ascomycota(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83)	Uncultured Ascomycota (KX621910)	87,1
A.2	170	Ascomycota(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92)	Uncultured fungus (MG244835)	86,31
A.4	167	Ascomycota(91); Sordariomycetes(85); Sordariomycetes sin clasificar(85); Sordariomycetes sin clasificar(85); Sordariomycetes sin clasificar(85)	Uncultured Ascomycota (KX621925)	89,41
A.5	185	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Nectriaceae sin clasificar(100)	Fusarium equiseti (MK770797)	95,68
A.6	190	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Fusarium(96)	Fusarium oxysporum (MK894888)	100
A.7	185	Ascomycota(100); Sordariomycetes(96); Hypocreales(93); Nectriaceae(90); Fusarium(86)	Uncultured Ascomycota (KX621910)	93,48
A.8	163	Ascomycota(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89)	Fusarium equiseti (MN833410)	96,86
A.11	184	Ascomycota(99); Sordariomycetes(99); Hypocreales(98); Nectriaceae(91); Fusarium(88)	Uncultured Ascomycota (KX621925)	92,82
A.12	132	Ascomycota(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96)	Fusarium equiseti (MH141282)	89,39
A.16	191	Ascomycota(100); Dothideomycetes(100); Capnodiales(100); Cladosporiaceae(100); Cladosporium(100)	Cladosporium sp. (LC433822)	100
A.17	196	Ascomycota(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92)	Uncultured fungus (JX342938)	85
A.20	166	Ascomycota(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83)	Fusarium equiseti (MK336490)	89,84
A.21	192	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(96); Microascaceae(96); Microascaceae sin clasificar(96)	Uncultured Ascomycota (KX621921)	92,75
A.22	188	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Fusarium(80)	Fusarium equiseti (MK770797)	97,34
A.23	185	Ascomycota(90); Ascomycota sin clasificar(90); Ascomycota sin clasificar(90); Ascomycota sin clasificar(90); Ascomycota sin clasificar(90)	uncultured Ascomycota (KX621925)	87,97

Tabla S5.1 continuación

Banda	Longitud (bp)	Afiliación taxonómica (Filo, Clase, Orden, Familia, Género)	Mayor e-Value Blast (accession no.)	% similitud
A.1	240	Ascomycota(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83)	Uncultured Ascomycota (KX621910)	87,1
A.2	170	Ascomycota(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92)	Uncultured fungus (MG244835)	86,31
A.4	167	Ascomycota(91); Sordariomycetes(85); Sordariomycetes sin clasificar(85); Sordariomycetes sin clasificar(85); Sordariomycetes sin clasificar(85)	Uncultured Ascomycota (KX621925)	89,41
A.5	185	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Nectriaceae sin clasificar(100)	Fusarium equiseti (MK770797)	95,68
A.6	190	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Fusarium(96)	Fusarium oxysporum (MK894888)	100
A.7	185	Ascomycota(100); Sordariomycetes(96); Hypocreales(93); Nectriaceae(90); Fusarium(86)	Uncultured Ascomycota (KX621910)	93,48
A.8	163	Ascomycota(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89)	Fusarium equiseti (MN833410)	96,86
A.11	184	Ascomycota(99); Sordariomycetes(99); Hypocreales(98); Nectriaceae(91); Fusarium(88)	Uncultured Ascomycota (KX621925)	92,82
A.12	132	Ascomycota(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96)	Fusarium equiseti (MH141282)	89,39
A.16	191	Ascomycota(100); Dothideomycetes(100); Capnodiales(100); Cladosporiaceae(100); Cladosporium(100)	Cladosporium sp. (LC433822)	100
A.17	196	Ascomycota(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92); Ascomycota sin clasificar(92)	Uncultured fungus (JX342938)	85
A.20	166	Ascomycota(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83)	Fusarium equiseti (MK336490)	89,84
A.21	192	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(96); Microascaceae(96); Microascaceae sin clasificar(96)	Uncultured Ascomycota (KX621921)	92,75
A.22	188	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Fusarium(80)	Fusarium equiseti (MK770797)	97,34
A.23	185	Ascomycota(90); Ascomycota sin clasificar(90); Ascomycota sin clasificar(90); Ascomycota sin clasificar(90); Ascomycota sin clasificar(90)	uncultured Ascomycota (KX621925)	87,97
A.24	170	Ascomycota(100); Sordariomycetes(99); Hypocreales(99); Nectriaceae(99); Fusarium(92)	Fusarium equiseti (MK770797)	97,06
A.25	150	Mortierellomycota(100); Mortierellomycetes(100); Mortierellales(100); Mortierellaceae(100); Mortierella(100)	Mortierella sp. (KX150447)	100
A.28	189	Mortierellomycota(100); Mortierellomycetes(100); Mortierellales(100); Mortierellaceae(100); Mortierella(100)	Uncultured Mortierella (MF555542)	100
B.1	244	Ascomycota(100); Pezizomycetes(99); Pezizales(99); Pyronemataceae(99); Pyronemataceae sin clasificar(99)	Fungal sp. strain YA-1 (MF784638)	99,59
B.2	178	Mortierellomycota(100); Mortierellomycetes(100); Mortierellales(100); Mortierellaceae(100); Mortierella(100)	Uncultured Mortierella (MF555542)	100
B.3	252	Ascomycota(99); Pezizomycetes(94); Pezizales(94); Pyronemataceae(94); Pyronemataceae sin clasificar(94)	Fungal sp. strain YA-1 (MF784638)	99,21
B.4	172	Mortierellomycota(100); Mortierellomycetes(100); Mortierellales(100); Mortierellaceae(100); Mortierella(100)	Mortierella indohii (JX975878)	95,35
B.6	188	Basidiomycota(84); Agaricomycetes(80); Agaricomycetes sin clasificar(80); Agaricomycetes sin clasificar(80); Agaricomycetes sin clasificar(80)	Uncultured fungus (AB520436)	81,03
B.9	167	Ascomycota(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83)	Sin resultados significativos en el BLAST	
B.13	172	Basidiomycota(91); Basidiomycota sin clasificar(91); Basidiomycota sin clasificar(91); Basidiomycota sin clasificar(91); Basidiomycota sin clasificar(91)	Uncultured fungus (JX332265)	93,02
B.14	174	Ascomycota(98); Ascomycota sin clasificar(98); Ascomycota sin clasificar(98); Ascomycota sin clasificar(98); Ascomycota sin clasificar(98)	Fusarium sp (KJ572172)	85,94
B.15	163	Ascomycota(97); Sordariomycetes(86); Sordariomycetes sin clasificar(86); Sordariomycetes sin clasificar(86); Sordariomycetes sin clasificar(86)	Uncultured fungus (JX368482)	92,45
B.17	154	Ascomycota(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83); Ascomycota sin clasificar(83)	Fusarium cf. avenaceum (MH128208)	86,99
B.19	282	Ascomycota(97); Ascomycota sin clasificar(97); Ascomycota sin clasificar(97); Ascomycota sin clasificar(97); Ascomycota sin clasificar(97)	Gymnascella aurantiaca (KY629638)	87,98
B.21	147	Ascomycota(91); Ascomycota sin clasificar(91); Ascomycota sin clasificar(91); Ascomycota sin clasificar(91); Ascomycota sin clasificar(91)	Uncultured fungus (JN394950)	100
B.22	171	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	

Tabla S5.1 continuación

Banda	Longitud (bp)	Afiliación taxonómica (Filó, Clase, Orden, Familia, Género)	Mayor e-Value Blast (accession no.)	% similitud
B.23	193	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Stachybotryaceae(100); Stachybotrys(100)	Stachybotrys chartarum (MN689323)	100
B.26	164	Ascomycota(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87)	Uncultured Nectriaceae (FJ708605)	100
B.27	210	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(99); Trichophaeopsis(85)	Uncultured fungus (JX323746)	98,1
B.28	194	Ascomycota(94); Ascomycota sin clasificar(94); Ascomycota sin clasificar(94); Ascomycota sin clasificar(94); Ascomycota sin clasificar(94)	Auxarthron kuehnii (AB861654)	86,08
B.29	157	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
B.30	151	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
B.33	176	Ascomycota(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87)	Uncultured fungus (MG244835)	82
B.36	175	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Auxarthron kuehnii (AB861654)	86,08
B.37	158	Ascomycota(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89); Ascomycota sin clasificar(89)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	94,9
B.38	159	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
B.39	149	Ascomycota(91); Ascomycota sin clasificar(91); Ascomycota sin clasificar(91); Ascomycota sin clasificar(91); Ascomycota sin clasificar(91)	Fusarium sp (KJ572172)	88,67
B.40	159	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Uncultured fungus (MG244835)	83,23
B.41	159	Ascomycota(82); Ascomycota sin clasificar(82); Ascomycota sin clasificar(82); Ascomycota sin clasificar(82); Ascomycota sin clasificar(82)	Fungal sp. 51651 (KP890634)	86
B.43	191	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(100); Microascaceae(100); Microascaceae sin clasificar(100)	Uncultured Ascomycota (KX621921)	97,92
B.44	180	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Stachybotryaceae(100); Stachybotrys(100)	Stachybotrys chlorohalonata (LC406458)	98,9
B.45	158	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
C.1	132	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
C.2	162	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Trichophaeopsis(90)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	98,77
C.3	116	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
C.4	200	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Trichophaeopsis(87)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	98,5
C.5	192	Basidiomycota(96); Tremellomycetes(94); Filobasidiales(94); Piskurozymaceae(94); Soliicocozyma(94)	Solicoozyma aerea (MK408440)	94,27
C.6	173	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(100); Microascaceae(100); Microascaceae sin clasificar(100)	Sordariomycetes sp. (MH430385)	98,28
C.7	194	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(100); Microascaceae(100); Microascaceae sin clasificar(100)	Uncultured Ascomycota (HG936340)	96,91
C.9	149	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Uncultured fungus (MF793575)	86,32
C.12	196	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Pyronemataceae sin clasificar(100)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	98,97
C.14	191	Basidiomycota(100); Agaricomycetes(100); Polyporales(100); Coriolaceae(98); Trametes(98)	Trametes versicolor (AB733644)	95,81
C.16	115	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Uncultured fungus (JX354927)	91,74
C.18	145	Basidiomycota(100); Tremellomycetes(100); Tremellales(100); Trimorphomycetaceae(100); Saitozyma(99)	Saitozyma podzolica (LC506272)	98,62
C.21	223	Ascomycota(88); Ascomycota sin clasificar(88); Ascomycota sin clasificar(88); Ascomycota sin clasificar(88); Ascomycota sin clasificar(88)	Fungal sp. strain YA-1 (MF784638)	95,96
C.24	157	Basidiomycota(100); Wallemiomycetes(100); Wallemiales(100); Wallemiaceae(100); Wallemia(100)	Wallemia mellicola (MH855488)	99,35
C.28	133	Ascomycota(96); Pezizomycetes(93); Pezizales(93); Pyronemataceae(92); Pyronemataceae sin clasificar(92)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	96,24
C.29	156	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Pyronemataceae sin clasificar(100)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	99,36
C.30	188	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Pyronemataceae sin clasificar(100)	Pezizomycetes sp. (FN868473)	96,81
C.31	175	Ascomycota(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87); Ascomycota sin clasificar(87)	Uncultured Ascomycota (HG936340)	88,62

Tabla S5.1 continuación

Banda	Longitud (bp)	Afiliación taxonómica (Filo, Clase, Orden, Familia, Género)	Mayor e-Value Blast (accession no.)	% similitud
C.32	190	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(100); Microasceae(100); Microasceae sin clasificar(100)	Uncultured Ascomycota (HG936340)	96,88
C.35	159	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Microascales(100); Microasceae(100); Microasceae sin clasificar(100)	Uncultured Ascomycota (HG936340)	98,74
D.1	211	Mortierellomycota(100); Mortierellomycetes(100); Mortierellales(100); Mortierellaceae(100); Mortierella(100)	Mortierella indohii (JX975878)	97,16
D.4	210	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(99); Trichophaeopsis(85)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	98,54
D.5	136	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
D.6	135	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
D.7	223	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Trichophaeopsis(89)	Uncultured fungus (JX323746)	98,18
D.8	196	Ascomycota(100); Pezizomycetes(100); Pezizales(100); Pyronemataceae(100); Trichophaeopsis(87)	Uncultured fungus (JX323746)	97,96
D.9	232	Ascomycota(99); Pezizomycetes(97); Pezizales(97); Pyronemataceae(97); Pyronemataceae sin clasificar(97)	Uncultured fungus (JX323746)	93,59
D.10	165	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
D.12	184	Basidiomycota(100); Agaricomycetes(100); Polyporales(100); Coriolaceae(100); Trametes(100)	Trametes versicolor (MN961144)	99,46
D.13	166	Ascomycota(100); Sordariomycetes(100); Hypocreales(100); Nectriaceae(100); Fusarium(91)	Fusarium longipes (MT032394)	98,8
D.14	127	Ascomycota(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96); Ascomycota sin clasificar(96)	Uncultured Ascomycota (HG936357)	85,5
D.15	135	Ascomycota(80); Ascomycota sin clasificar(80); Ascomycota sin clasificar(80); Ascomycota sin clasificar(80); Ascomycota sin clasificar(80)	Sin resultados significativos en el BLAST	
D.16	195	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	
D.18	154	Ascomycota(97); Pezizomycetes(92); Pezizales(92); Pyronemataceae(92); Pyronemataceae sin clasificar(92)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	95,36
D.20	183	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Uncultured fungus (FJ782315)	92,31
D.23	149	Ascomycota(99); Pezizomycetes(95); Pezizales(95); Pyronemataceae(93); Pyronemataceae sin clasificar(93)	Pezizomycetes sp. (HQ829414)	95,97
D.24	158	Ascomycota(94); Ascomycota sin clasificar(94); Ascomycota sin clasificar(94); Ascomycota sin clasificar(94); Ascomycota sin clasificar(94)	Uncultured fungus (GQ511845)	90,34
D.26	182	Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100); Fungi sin clasificar(100)	Sin resultados significativos en el BLAST	

Tabla S5.2. Afiliación filogenética de las secuencias bacterianas representativas de cada tipo de suelo según el test LEfSe. En gris se han destacado los géneros que sólo figuran en una de las dos variables, suelos conductivos o suelos supresivos.

Tipo	Tamaño	Filo	Género ⁺
Conductivo	427	Acidobacteria	Subgrupo Gp10
Conductivo	1697	Acidobacteria	Subgrupo Gp16
Conductivo	146	Acidobacteria	Subgrupo Gp17
Conductivo	349	Acidobacteria	Subgrupo Gp25
Conductivo	1765	Acidobacteria	Subgrupo Gp3
Conductivo	2785	Acidobacteria	Subgrupo Gp4
Conductivo	149	Acidobacteria	Subgrupo Gp5
Conductivo	3244	Acidobacteria	Subgrupo Gp6
Conductivo	145	Acidobacteria	Acidobacteria sin clasificar
Conductivo	152	Actinobacteria	Aciditerrimonas
Conductivo	674	Actinobacteria	Actinobacteria sin clasificar
Conductivo	337	Actinobacteria	Actinomycetales sin clasificar
Conductivo	294	Actinobacteria	Glycomyces
Conductivo	964	Actinobacteria	Intrasporangiaceae sin clasificar
Conductivo	352	Actinobacteria	Phycococcus
Conductivo	155	Actinobacteria	Catellatospora
Conductivo	157	Actinobacteria	Nocardia
Conductivo	373	Actinobacteria	Kribbella
Conductivo	682	Actinobacteria	Nocardioides
Conductivo	433	Actinobacteria	Pseudonocardia
Conductivo	374	Actinobacteria	Pseudonocardiaceae sin clasificar
Conductivo	1052	Actinobacteria	Streptomyces
Conductivo	978	Actinobacteria	Streptomycetaceae sin clasificar
Conductivo	89	Actinobacteria	Planomonospora
Conductivo	272	Armatimonadetes	Armatimonadetes gp4
Conductivo	116	Armatimonadetes	Armatimonadetes gp5
Conductivo	243	Armatimonadetes	Chthonomonas Armatimonadetes gp3
Conductivo	25991	Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar
Conductivo	349	Bacteroidetes	Ohtaekwangia
Conductivo	2737	Bacteroidetes	Bacteroidetes sin clasificar
Conductivo	182	Bacteroidetes	Chryseobacterium
Conductivo	518	Bacteroidetes	Flavobacterium
Conductivo	107	Bacteroidetes	Chitinophaga
Conductivo	8678	Bacteroidetes	Chitinophagaceae sin clasificar
Conductivo	253	Bacteroidetes	Ferruginibacter
Conductivo	922	Bacteroidetes	Flavisolibacter
Conductivo	212	Bacteroidetes	Flavitalea
Conductivo	161	Bacteroidetes	Parasegetibacter

Tabla S5.2 continuación

Tipo	Tamaño	Filo	Género*
Conductivo	2148	Bacteroidetes	Terrimonas
Conductivo	501	Bacteroidetes	Algoriphagus
Conductivo	1710	Bacteroidetes	Adhaeribacter
Conductivo	396	Bacteroidetes	Cytophagaceae sin clasificar
Conductivo	110	Bacteroidetes	Dyadobacter
Conductivo	123	Bacteroidetes	Pontibacter
Conductivo	87	Bacteroidetes	Rhodocytophaga
Conductivo	945	Bacteroidetes	Pedobacter
Conductivo	303	Bacteroidetes	Sphingobacteriales sin clasificar
Conductivo	694	Chloroflexi	Anaerolineaceae sin clasificar
Conductivo	106	Chloroflexi	Herpetosiphon
Conductivo	386	Chloroflexi	Chloroflexi sin clasificar
Conductivo	456	Chloroflexi	Sphaerobacter
Conductivo	839	Firmicutes	Tumebacillus
Conductivo	2303	Firmicutes	Bacillus
Conductivo	265	Firmicutes	Paenibacillus
Conductivo	2624	Gemmatimonadetes	Gemmatimonas
Conductivo	594	Nitrospira	Nitrospira
Conductivo	87	OP11	OP11 genus IS
Conductivo	120	Planctomycetes	Planctomycetaceae sin clasificar
Conductivo	135	Proteobacteria	Alphaproteobacteria sin clasificar
Conductivo	132	Proteobacteria	Brevundimonas
Conductivo	126	Proteobacteria	Caulobacteraceae sin clasificar
Conductivo	327	Proteobacteria	Bradyrhizobiaceae sin clasificar
Conductivo	188	Proteobacteria	Devosia
Conductivo	389	Proteobacteria	Hyphomicrobiaceae sin clasificar
Conductivo	76	Proteobacteria	Methylobacterium
Conductivo	944	Proteobacteria	Microvirga
Conductivo	119	Proteobacteria	Mesorhizobium
Conductivo	398	Proteobacteria	Rhizobium
Conductivo	2186	Proteobacteria	Rhizobiales sin clasificar
Conductivo	275	Proteobacteria	Paracoccus
Conductivo	102	Proteobacteria	Rhodobacteraceae sin clasificar
Conductivo	3082	Proteobacteria	Skermanella
Conductivo	81	Proteobacteria	Rhodospirillales sin clasificar
Conductivo	957	Proteobacteria	Sphingomonadaceae sin clasificar
Conductivo	205	Proteobacteria	Sphingopyxis
Conductivo	4540	Proteobacteria	Betaproteobacteria sin clasificar
Conductivo	747	Proteobacteria	Oxalobacteraceae sin clasificar

Tabla S5.2 continuación

Tipo	Tamaño	Filo	Género*
Conductivo	899	Proteobacteria	Myxococcales sin clasificar
Conductivo	106	Proteobacteria	Chondromyces
Conductivo	131	Proteobacteria	Sorangium
Conductivo	262	Proteobacteria	Yersinia
Conductivo	343	Proteobacteria	Gilvimirinus
Conductivo	2193	Proteobacteria	Gammaproteobacteria sin clasificar
Conductivo	783	Proteobacteria	Cellvibrio
Conductivo	359	Proteobacteria	Pseudomonas
Conductivo	102	Proteobacteria	Steroidobacter
Conductivo	142	Proteobacteria	Stenotrophomonas
Conductivo	482	Proteobacteria	Proteobacteria sin clasificar
Conductivo	200	Verrucomicrobia	Alterococcus
Conductivo	903	Verrucomicrobia	Opitutus
Conductivo	166	Verrucomicrobia	Spartobacteria family IS sin clasificar
Conductivo	643	Verrucomicrobia	Spartobacteria genera IS
Conductivo	1036	Verrucomicrobia	3 genus IS
Supresivo	250	Acidobacteria	Subgrupo Gp18
Supresivo	4656	Acidobacteria	Subgrupo Gp3
Supresivo	16687	Acidobacteria	Subgrupo Gp4
Supresivo	105103	Acidobacteria	Subgrupo Gp6
Supresivo	130	Acidobacteria	Subgrupo Gp7
Supresivo	8651	Actinobacteria	Actinobacteria sin clasificar
Supresivo	3233	Actinobacteria	Actinomycetales sin clasificar
Supresivo	403	Actinobacteria	Microbacteriaceae sin clasificar
Supresivo	5577	Actinobacteria	Micrococcaceae sin clasificar
Supresivo	763	Actinobacteria	Micromonosporaceae sin clasificar
Supresivo	590	Actinobacteria	Nocardiodaceae sin clasificar
Supresivo	819	Actinobacteria	Nocardioides
Supresivo	237	Actinobacteria	Nocardiopsaceae sin clasificar
Supresivo	5787	Actinobacteria	Rubrobacter
Supresivo	3593	Actinobacteria	Solirubrobacter
Supresivo	1559	Actinobacteria	Solirubrobacterales sin clasificar
Supresivo	342	Armatimonadetes	Chthonomonas Armatimonadetes gp3
Supresivo	35324	Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar
Supresivo	11224	Bacteroidetes	Ohtaekwangia
Supresivo	520	Bacteroidetes	Bacteroidetes sin clasificar
Supresivo	138	Bacteroidetes	Chitinophagaceae sin clasificar
Supresivo	428	Bacteroidetes	Pontibacter
Supresivo	1192	Bacteroidetes	Flammeovirgaceae sin clasificar

Tabla S5.2 continuación

Tipo	Tamaño	Filo	Género ⁺
Supresivo	2613	Chloroflexi	Chloroflexi sin clasificar
Supresivo	1963	Firmicutes	Bacillaceae 1 sin clasificar
Supresivo	3811	Firmicutes	Bacillaceae 2 sin clasificar
Supresivo	1981	Firmicutes	Halobacillus
Supresivo	1115	Firmicutes	Thalassobacillus
Supresivo	753	Firmicutes	Virgibacillus
Supresivo	13553	Firmicutes	Bacillales sin clasificar
Supresivo	1107	Firmicutes	Ammoniphilus
Supresivo	1781	Firmicutes	Pasteuria
Supresivo	1064	Firmicutes	Planococcaceae sin clasificar
Supresivo	626	Firmicutes	Thermoactinomyces
Supresivo	2883	Gemmatimonadetes	Gemmatimonas
Supresivo	1935	Nitrospira	Nitrospira
Supresivo	326	Planctomycetes	Blastopirellula
Supresivo	1608	Planctomycetes	Planctomycetaceae sin clasificar
Supresivo	6012	Proteobacteria	Alphaproteobacteria sin clasificar
Supresivo	580	Proteobacteria	Devosia
Supresivo	1184	Proteobacteria	Rhizobiales sin clasificar
Supresivo	352	Proteobacteria	Pelagibius
Supresivo	188	Proteobacteria	Rhodospirillaceae sin clasificar
Supresivo	215	Proteobacteria	Rhodospirillales sin clasificar
Supresivo	1099	Proteobacteria	Erythrobacteraceae sin clasificar
Supresivo	1224	Proteobacteria	Sphingomonadaceae sin clasificar
Supresivo	9106	Proteobacteria	Betaproteobacteria sin clasificar
Supresivo	419	Proteobacteria	Pusillimonas
Supresivo	1278	Proteobacteria	Burkholderiales sin clasificar
Supresivo	478	Proteobacteria	Nitrosomonas
Supresivo	811	Proteobacteria	Deltaproteobacteria sin clasificar
Supresivo	1203	Proteobacteria	Myxococcales sin clasificar
Supresivo	9038	Proteobacteria	Gammaproteobacteria sin clasificar
Supresivo	1742	Proteobacteria	Halomonas
Supresivo	235	Proteobacteria	Serpens
Supresivo	3741	Proteobacteria	Steroidobacter
Supresivo	5852	Proteobacteria	Lysobacter
Supresivo	195	Proteobacteria	Pseudoxanthomonas
Supresivo	3015	Proteobacteria	Proteobacteria sin clasificar
Supresivo	334	Verrucomicrobia	Spartobacteria genera IS
Supresivo	5424	Verrucomicrobia	3 genus IS

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género, se ha clasificado con el taxón más específico

Tabla S5.3 Número de secuencias, pertenecientes a cada uno de los grupos funcionales detectados mediante FAPROTAX para cada una de las muestras analizadas.

Función	C1 [^]	C4 [^]	H1 [^]	H4 [^]	K1 [^]	K3 [^]	N1 [^]	N4 [^]
Parásitos intracelulares*	541	490	317	510	430	334	2542	2540
Oxidación oscura del hidrógeno*	79	104	11	56	49	17	151	247
Fijación de nitrógeno*	132	82	122	126	144	111	213	164
Oxidación de metanol*	82	249	59	93	109	207	275	449
Reducción de arseniato disimilatorio*	4	13	3	31	10	4	29	57
Desintoxicación de arseniato*	4	13	3	31	10	4	28	57
Quimioheterotrofia aeróbica*	16208	16861	13546	16385	18419	22927	26525	22859
Quimioheterotrofia*	17962	18701	15359	18032	20580	25381	29343	24708
Metilotropía*	84	312	65	96	109	213	281	456
Oxidación de manganeso*	50	30	19	27	25	31	8	13
Oxidación aeróbica de amoníaco	212	225	183	229	480	262	385	623
Respiración de sulfato	17	20	28	12	10	10	4	5
Oxidación oscura de hierro	0	0	1	4	1	1	0	0
Fotoautotrofia de Fe oxidante	0	0	1	4	1	1	0	0
Oxidación de sulfuro oscuro	0	2	3	0	0	1	0	0
Respiración con tiosulfato	30	46	18	29	6	10	0	6
Reducción de nitrato	2989	3252	2932	4592	3535	4037	3006	2364
Oxidación aeróbica de nitrito	1860	1515	1320	1601	1896	1307	1194	1316
Degradación de hidrocarburos	391	295	339	182	1541	114	102	109
Respiración de compuestos de azufre	45	55	46	48	21	21	17	28
Amonificación de nitrato	19	29	11	21	3	10	8	2
Fermentación	1786	1854	1650	1733	1419	2103	4238	2783
Respiración de sulfito	11	17	8	8	3	0	0	4
Ureolisis	1432	1300	619	720	571	1764	2508	907
Presencia en el Intestino humano	7	9	9	18	11	4	12	12
Parásitos invertebrados	4	4	1	14	9	0	3	3
Degradación de hidrocarburos alifáticos sin metano	64	61	244	158	120	55	85	86
Degradación de hidrocarburos aromáticos	64	59	241	158	120	55	85	85
Celulolisis	562	551	548	550	355	410	708	463
Oxidación oscura de azufre	0	0	2	0	0	0	0	0
Anammox	0	0	0	0	0	0	10	2
Respiración de manganeso	0	0	0	0	0	0	5	1
Quitinolisis	715	570	603	351	1124	994	664	359
Cianobacterias	161	209	118	159	77	188	127	110
Fotoautotrofia oxigenada	161	209	118	159	77	188	127	110
Intestino de mamífero	7	9	9	18	11	9	12	12
Patógeno vegetal	215	89	71	164	74	91	170	142
Amonificación de nitrito	22	32	14	26	7	14	17	11
Respiración de arseniato	0	0	0	0	0	0	1	0
Acetogénesis reductora	10	8	1	5	2	6	4	3
Oxidación oscura de compuestos de azufre	5	45	3	41	6	3	4	9
Cloroplastos	2	4	5	6	12	15	34	7
Fotoautotrofia	717	617	640	1101	772	1140	886	501

Tablas S5.3 continuación

Función	C1 [^]	C4 [^]	H1 [^]	H4 [^]	K1 [^]	K3 [^]	N1 [^]	N4 [^]
Reductores de clorato	0	0	12	0	0	1	81	1
Metanotrofia	2	63	6	3	0	6	6	7
Respiración de hierro	12	17	15	8	4	0	22	5
Oxidación oscura del tiosulfato	2	37	2	17	2	1	0	7
Fotoautotrofia anoxigénica S oxidante	556	404	521	940	695	952	755	390
Fotoautotrofia anoxigénica	556	408	522	942	695	952	759	391
Respiración de azufre	20	23	16	23	11	1	13	25
Respiración de nitrógeno	800	562	644	1382	1241	1008	1259	870
Fototrofia	745	659	661	1141	804	1191	1003	548
Respiración de nitrato	797	559	641	1377	1237	1004	1240	859
Nitrificación	2072	1740	1503	1830	2376	1569	1579	1939
Ligninólisis	9	0	0	0	5	4	4	0
Patógenos humanos	179	67	74	406	217	112	297	124
Respiración con fumarato	0	0	11	0	0	0	5	1
Parásitos animales o simbioses	243	232	166	549	297	177	310	172
Depredador o exoparasitario	175	143	86	109	145	240	149	174
Degradación plástica	55	56	198	143	45	48	54	100
Degradación de compuestos aromáticos	786	789	1444	971	823	663	756	956
Fototrofia aeróbica anoxigénica	12	9	10	17	23	41	34	8
Fotoheterotrofia	578	431	533	973	692	984	876	438
Xilanólisis	194	163	102	166	147	114	174	115
Desnitrificación de nitrato	687	457	537	968	692	962	839	610
Desnitrificación de nitrito	687	457	537	968	692	962	839	610
Desnitrificación de óxido nitroso	687	457	537	968	692	962	839	610
Desnitrificación	687	457	537	968	692	962	839	610
Respiración de nitrito	711	490	552	1000	699	976	866	624
Fotoautotrofia anoxigénica oxidante de H ₂	0	4	3	6	1	1	4	1

[^]Cada muestra se identifica con un código de dos caracteres, el primero identifica el suelo analizado (C: Castellà, H: Hidalgo, K: Kyoto, N: Noé) y el segundo se corresponde con la fecha en la que se realizaron los muestreos (1, 2, 3 y 4) (tabla 3.4).

Tabla S5.4. Afiliación filogenética de las secuencias fúngicas representativas de cada tipo de suelo según el test LEfSe. En gris se han destacado las especies que sólo están en una de las variables (suelos conductivos o suelos supresivos).

Tipo	Tamaño	Filo	Especie ⁺
Supresor	532	Hongos sin clasificar	Hongos sin clasificar
Supresor	35964	Ascomycota	<i>Cladosporium</i> sin clasificar
Supresor	3123	Ascomycota	<i>Cladosporium halotolerans</i>
Supresor	367	Ascomycota	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>
Supresor	5971	Ascomycota	<i>Arachniotus dankaliensis</i>
Supresor	2283	Ascomycota	<i>Pseudogymnoascus</i>
Supresor	7219	Ascomycota	Pyronemataceae sin clasificar
Supresor	323591	Ascomycota	<i>Pseudombrophila</i> sin clasificar
Supresor	5331	Ascomycota	<i>Acremonium alcalophilum</i>
Supresor	420362	Ascomycota	Microascaceae sin clasificar
Supresor	130420	Ascomycota	Chaetomiaceae sin clasificar
Tipo	Tamaño	Filo	Especie ⁺

10. Anexos

Supresor	24575	Mortierellomycota	Mortierellaceae sin clasificar
Supresor	1231	Mortierellomycota	Mortierella sin clasificar
Supresor	1239	Mortierellomycota	Mortierella alpina
Supresor	1608	Mortierellomycota	Mortierella oligospora
Conductivo	329	Hongos sin clasificar	Hongos sin clasificar
Conductivo	927	Ascomycota	Dothideomycetes sin clasificar
Conductivo	90	Ascomycota	Hysteriaceae sin clasificar
Conductivo	5484	Ascomycota	Didymellaceae sin clasificar
Conductivo	177	Ascomycota	Phoma adonidicola
Conductivo	2125	Ascomycota	Alternaria alstroemeriae
Conductivo	769	Ascomycota	Stemphylium sin clasificar
Conductivo	857	Ascomycota	Sporormiaceae sin clasificar
Conductivo	3265	Ascomycota	Sordariomycetes sin clasificar
Conductivo	32734	Ascomycota	Gibellulopsis
Conductivo	10372	Ascomycota	Lectera
Conductivo	2322	Ascomycota	Verticillium klebahnii
Conductivo	73	Ascomycota	Verticillium longisporum
Conductivo	745	Ascomycota	Clonostachys rosea
Conductivo	149	Ascomycota	Clonostachys
Conductivo	902	Ascomycota	Bionectriaceae sin clasificar
Conductivo	326	Ascomycota	Acremonium hansfordii
Conductivo	253	Ascomycota	Acremonium pilosum
Conductivo	207508	Ascomycota	Nectriaceae sin clasificar
Conductivo	21253	Ascomycota	Fusarium sin clasificar
Conductivo	458	Ascomycota	Fusicolla sin clasificar
Conductivo	4760	Ascomycota	Rodentomyces
Conductivo	207	Ascomycota	Stephanonectria sin clasificar
Conductivo	697	Ascomycota	Volutella ciliata
Conductivo	1799	Ascomycota	Eucasphaeria capensis
Conductivo	463	Ascomycota	Hypocreales sin clasificar
Conductivo	692	Ascomycota	Thielaviopsis basicola
Conductivo	1967	Ascomycota	Lasiosphaeriaceae sin clasificar
Conductivo	313	Basidiomycota	Minimedusa
Conductivo	3006	Basidiomycota	Cystofilobasidium macerans
Conductivo	1515	Basidiomycota	Solicoccozyma terrea
Conductivo	1405	Basidiomycota	Holtermanniella sin clasificar
Conductivo	1762	Basidiomycota	Vishniacozyma carnescens
Conductivo	378	Basidiomycota	Vishniacozyma
Conductivo	162	Chytridiomycota	GS13 sin clasificar
Conductivo	323	Chytridiomycota	Chytridiomycota sin clasificar
Conductivo	38288	Mortierellomycota	Mortierella sin clasificar
Conductivo	2483	Mortierellomycota	Mortierellales sin clasificar
Conductivo	797	Olpidiomycota	Olpidium

* en los casos en los que no ha sido posible determinar la especie, se ha clasificado con el taxón más específico

10.4 Anexo suplementario capítulo 6

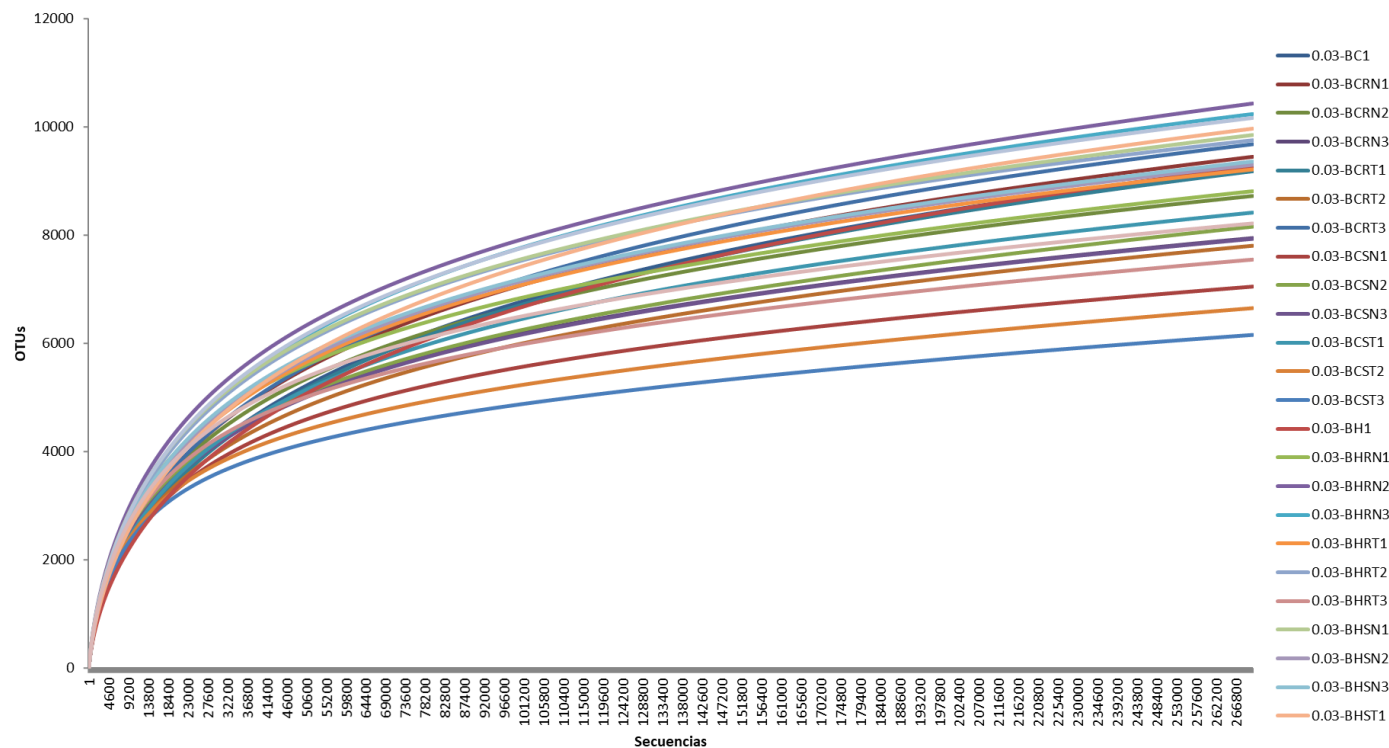


Figura S6.1. Curvas de rarefacción de las sub muestras utilizadas para el análisis de β -diversidad de las poblaciones bacterianas. Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al bacterioma (B); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: con *Trichoderma*, N: Sin *Trichoderma*; y el número es la réplica procedimental.

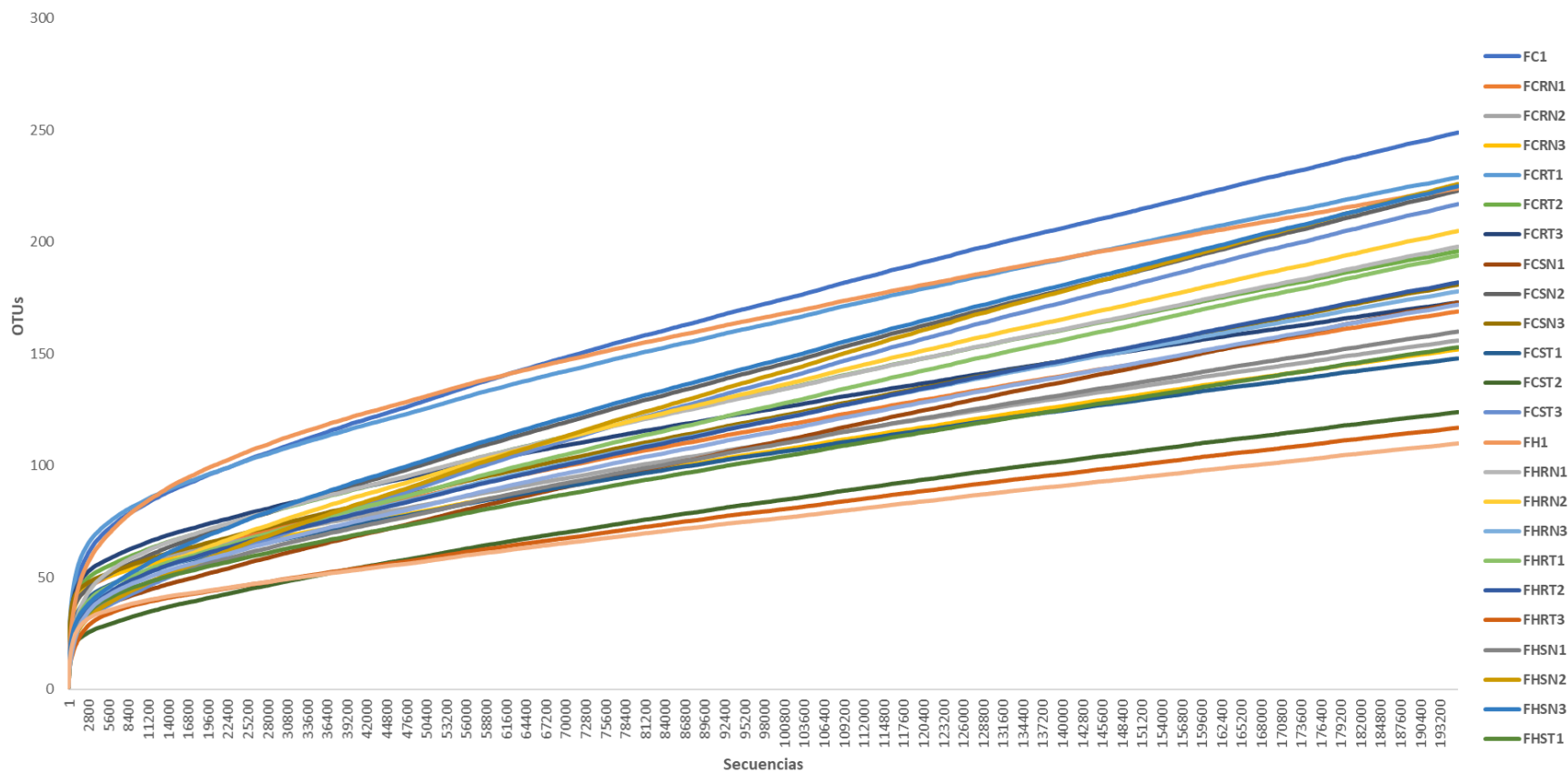


Figura S6.2 Curvas de rarefacción de las sub muestras utilizadas para el análisis de β -diversidad de las poblaciones fúngicas. Las muestras se identifican mediante un código de 5 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al microbioma (F); la segunda, la procedencia del suelo, C: *Castellà* o H: *Hidalgo*; la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (*Monika*) o S: susceptible (*Durinta*); la cuarta, la presencia o ausencia de inóculo T: con *Trichoderma*, N: Sin *Trichoderma*; y el número es la réplica procedimental.

Tabla S6.1 Afiliación filogenética, a nivel de género, de las secuencias bacterianas representativas y número de secuencias para cada tipo de suelo, según el algoritmo LEfSe.

Filo	Género ⁺	Castella	Hidalgo
Acidobacteria	Acidobacteria sin clasificar	0	3666
	<i>Gp10</i>	0	2196
	<i>Gp16</i>	0	1901
	<i>Gp3</i>	31542	2101
	<i>Gp4</i>	25230	14199
	<i>Gp6</i>	25012	11509
	<i>Gp7</i>	1887	1999
	<i>Gp9</i>	760	0
Actinobacteria	<i>Aciditerrimonas</i>	0	674
	Actinobacteria sin clasificar	37082	9693
	Actinomycetales sin clasificar	2233	4487
	<i>Actinophytocola</i>	0	2467
	<i>Actinoplanes</i>	0	1601
	<i>Aeromicrobium</i>	4137	0
	<i>Agromyces</i>	6769	5276
	<i>Arthrobacter</i>	11027	2454
	<i>Blastococcus</i>	0	4250
	Geodermatophilaceae sin clasificar	2671	0
	<i>Glycomyces</i>	0	4157
	<i>Jiangella</i>	2422	0
	Microbacteriaceae sin clasificar	1557	0
	Micromonosporaceae sin clasificar	0	2014
	<i>Mycobacterium</i>	5419	0
	Nocardioideae sin clasificar	21744	0
	<i>Nocardioides</i>	0	4275
	<i>Phycococcus</i>	1238	0
	<i>Planobispora</i>	0	2111
	<i>Promicromonospora</i>	0	5899
	Pseudonocardiaceae sin clasificar	3161	0
	<i>Rubrobacter</i>	0	22146
	<i>Solirubrobacter</i>	14093	0
Solirubrobacterales sin clasificar	2533	0	
<i>Streptomyces</i>	13277	0	
Thermomonosporaceae sin clasificar	0	2843	
Armatimonadetes	Armatimonadetes gp5	1630	8631
Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar	111188	175858
Bacteroidetes	<i>Adhaeribacter</i>	6643	0
	<i>Algoriphagus</i>	0	6251
	Bacteroidetes sin clasificar	8625	44290
	<i>Chitinophaga</i>	0	3294
	Chitinophagaceae sin clasificar	14729	13913
	Cryomorphaceae sin clasificar	0	1876
	<i>Emticia</i>	1183	0
	Flammeovirgaceae sin clasificar	6279	3573
	<i>Flavisolibacter</i>	1753	0
	Flavobacteriaceae sin clasificar	41360	15413
	Flavobacteriales sin clasificar	0	677
	<i>Flavobacterium</i>	0	1057

Tabla S6.1 continuación

Filo	Género ⁺	Castella	Hidalgo
Bacteroidetes	<i>Fluviicola</i>	854	0
	<i>Lacibacter</i>	2833	1774
	<i>Ohtaekwangia</i>	1237	35198
	<i>Pedobacter</i>	5097	0
	<i>Pontibacter</i>	81237	0
	<i>Rhodocytophaga</i>	1020	0
	Rhodothermaceae sin clasificar	0	1274
	<i>Salegentibacter</i>	0	3280
	<i>Salinimicrobium</i>	0	1216
	<i>Salisaeta</i>	0	2922
	Sphingobacteriaceae sin clasificar	1616	0
	Sphingobacteriales sin clasificar	8202	1457
	<i>Terrimonas</i>	0	7182
Chloroflexi	Chloroflexi sin clasificar	0	3225
Deinococcus-Thermus	<i>Truepera</i>	0	1094
Firmicutes	Bacillaceae 1 sin clasificar	14660	4916
	Bacillaceae 2 sin clasificar	11990	689
	Bacillales sin clasificar	33873	1139
	<i>Gracilibacillus</i>	2442	0
	<i>Paenibacillus</i>	2594	0
	<i>Pasteuria</i>	0	2177
	Planococcaceae	611	0
	Sporolactobacillaceae	4178	0
	<i>Thermoactinomyces</i>	1194	0
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>	7771	17794
Nitrospira	<i>Nitrospira</i>	12514	7747
Planctomycetes	<i>Planctomyces</i>	1536	0
	Planctomycetaceae sin clasificar	10021	1353
Proteobacteria	Alcaligenaceae sin clasificar	1169	0
	Alphaproteobacteria sin clasificar	42893	11568
	Alteromonadaceae sin clasificar	2414	0
	<i>Arenimonas</i>	0	4009
	<i>Asticcacaulis</i>	1904	0
	Aurantimonadaceae sin clasificar	0	2950
	<i>Azoarcus</i>	0	1055
	Betaproteobacteria sin clasificar	2872	100512
	<i>Brevundimonas</i>	2339	0
	Burkholderiales sin clasificar	0	6446
	Comamonadaceae sin clasificar	0	1745
	<i>Corallococcus</i>	4991	0
	Cystobacteraceae sin clasificar	0	2895
	Deltaproteobacteria sin clasificar	1416	1699
	Desulfuromonadales sin clasificar	0	1126
	<i>Devosia</i>	4946	3830
	<i>Duganella</i>	0	3694
	<i>Enhygromyxa</i>	0	1913
	<i>Ensifer</i>	3974	0
	<i>Erythrobacter</i>	0	3161
	Erythrobacteraceae sin clasificar	3639	16046
	Gammaproteobacteria sin clasificar	14830	47355

Tabla S6.1 continuación

Filo	Género ⁺	Castella	Hidalgo
Proteobacteria	<i>Gemicoccus</i>	1157	0
	<i>Geobacter</i>	0	6606
	<i>Halomonas</i>	0	17427
	<i>Hydrogenophaga</i>	0	18448
	Hyphomicrobiaceae sin clasificar	7012	0
	<i>Koferia</i>	0	14634
	<i>Luteimonas</i>	5938	0
	<i>Lysobacter</i>	25069	2149
	<i>Marinobacter</i>	0	10970
	<i>Massilia</i>	9465	0
	<i>Methylobacillus</i>	0	7552
	<i>Methylophaga</i>	0	6649
	<i>Microvirga</i>	6105	0
	Myxococcales sin clasificar	5850	13093
	<i>Myxococcus</i>	1264	0
	<i>Novosphingobium</i>	3934	0
	Oxalobacteraceae sin clasificar	12131	0
	<i>Pelagibius</i>	0	2193
	<i>Peredibacter</i>	8004	0
	<i>Phenylobacterium</i>	4207	0
	Polyangiaceae sin clasificar	0	1094
	Proteobacteria sin clasificar	842	26926
	Pseudomonadaceae sin clasificar	1940	0
	<i>Pseudomonas</i>	8653	0
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	2257	0
	<i>Pusillimonas</i>	2406	0
	<i>Rheinheimera</i>	0	8474
	Rhizobiaceae sin clasificar	3240	0
	Rhizobiales sin clasificar	17590	3955
	<i>Rhizobium</i>	1756	4664
	Rhodobacteraceae sin clasificar	0	1840
	<i>Rhodoplanes</i>	0	1156
	Rhodospirillales sin clasificar	11087	6189
	<i>Salinicola</i>	0	761
	<i>Serpens</i>	0	821
	<i>Skermanella</i>	2136	0
	<i>Sphingobium</i>	8036	8695
	Sphingomonadaceae sin clasificar	18363	8632
	<i>Sphingomonas</i>	33216	0
	<i>Steroidobacter</i>	39070	25351
Xanthomonadaceae sin clasificar	1943	12678	
Verrucomicrobia	3 genus incertae sedis	19440	5776
	<i>Haloferula</i>	0	1981
	<i>Luteolibacter</i>	4010	4729
	<i>Opitutus</i>	1458	3885
	<i>Pelagicoccus</i>	0	611
	<i>Prostheco bacter</i>	840	0
	Verrucomicrobia sin clasificar	1851	0
	Verrucomicrobiaceae sin clasificar	2288	0

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico

Tabla S6.2 Afiliación filogenética, a nivel de género, de las secuencias bacterianas representativas y número de copias, para cada variedad de tomatara, según el algoritmo LEfSe.

Filo	Género ⁺	Iniciales	Resistente	Susceptible
Acidobacteria	Gp10	195	0	0
	Gp4	0	14997	0
	Gp7	0	6475	0
Actinobacteria	Acidimicrobiales sin clasificar	775	0	0
	<i>Actinomadura</i>	244	0	0
	Actinomycetales sin clasificar	9525	0	0
	<i>Aeromicrobium</i>	397	0	0
	<i>Kribbella</i>	332	0	0
	Nocardioideae sin clasificar	1008	0	0
	<i>Nocardioides</i>	1328	0	0
	<i>Nocardiosis</i>	439	0	0
	Promicromonosporaceae sin clasificar	1446	0	0
	Streptomycetaceae sin clasificar	409	0	0
Armatimonadetes	Gp4	0	0	851
Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar	2158	3874	14219
Bacteroidetes	<i>Adhaeribacter</i>	5658	0	0
	<i>Algoriphagus</i>	595	0	0
	Bacteroidetes sin clasificar	419	1007	2393
	Chitinophagaceae sin clasificar	0	3265	0
	Chitinophagaceae sin clasificar	0	0	3068
	<i>Dyadobacter</i>	0	2385	0
	Flammeovirgaceae sin clasificar	645	0	0
	Flavobacteriaceae sin clasificar	9403	0	516
	<i>Flavobacterium</i>	277	0	4365
	<i>Fluviicola</i>	0	0	942
	<i>Gracilimonas</i>	157	0	0
	<i>Ohtaekwangia</i>	3017	0	0
	<i>Pedobacter</i>	1227	0	0
	<i>Salisaeta</i>	0	0	2493
	Saprosiraceae sin clasificar	0	623	0
	<i>Sediminibacterium</i>	0	0	701
	Sphingobacteriaceae sin clasificar	2885	802	0
Firmicutes	<i>Oceanobacillus</i>	428	0	0
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>	0	2892	0
Planctomycetes	Planctomycetaceae sin clasificar	0	0	2572
	Planctomycetes sin clasificar	0	0	1903

Tabla S6.2 Continuación

Filo	Género ⁺	Iniciales	Resistente	Susceptible	
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	203	0	0	
	<i>Azoarcus</i>	0	0	1269	
	Betaproteobacteria sin clasificar	0	0	39922	
	Brucellaceae sin clasificar	181	0	0	
	<i>Cellvibrio</i>	0	38481	0	
	Comamonadaceae sin clasificar	0	9979	0	
	<i>Cronobacter</i>	225	0	0	
	Cystobacteraceae sin clasificar	0	975	942	
	Deltaproteobacteria sin clasificar	0	0	932	
	Enterobacteriaceae sin clasificar	1867	0	0	
	Gammaproteobacteria sin clasificar	260	0	2195	
	<i>Hydrogenophaga</i>	0	0	15277	
	<i>Lysobacter</i>	664	0	0	
	<i>Methylophilus</i>	0	1303	0	
	Myxococcales sin clasificar	356	0	0	
	Myxococcales sin clasificar	0	0	2704	
	<i>Nannocystis</i>	0	1867	0	
	<i>Pantoea</i>	1256	0	0	
	Proteobacteria sin clasificar	0	4694	0	
	<i>Pseudoalteromonas</i>	218	0	0	
	<i>Pseudomonas</i>	607	0	0	
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0	4888	0	
	<i>Rheinheimera</i>	0	1074	1184	
	<i>Rhizobium</i>	289	0	0	
	Rhodospirillales sin clasificar	0	0	1896	
	<i>Sphingobium</i>	0	7824	0	
	<i>Sphingomonas</i>	0	32602	0	
	Xanthomonadaceae sin clasificar	0	1656	0	
	Verrucomicrobia	Incertae sedis	0	0	23853
		<i>Haloferula</i>	0	0	1812
Opitutaceae sin clasificar		0	0	1203	
<i>Opitutus</i>		0	0	1497	
Verrucomicrobiaceae sin clasificar		0	2192	0	

⁺ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico

Tabla S6.3 Número de copias representativas cuando se compara la presencia o ausencia de *Trichoderma* en cada serie de macetas, según el algoritmo LEfse.

Filo	Género	Con <i>Trichoderma</i>				Sin <i>Trichoderma</i>			
		BCR	BCS	BHR	BHS	BCR	BCS	BHR	BHS
Acidobacteria	Acidobacteria sin clasificar	0	0	674	0	0	0	0	0
	Gp10	0	0	0	0	0	0	0	818
	Gp3	1247	0	0	0	0	0	0	0
	Gp4	2093	0	0	455	1247	2076	0	2363
	Gp5	606	0	0	0	0	0	0	0
	Gp6	4929	5544	0	0	0	0	840	4188
	Gp7	0	348	0	0	1483	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria sin clasificar	1406	0	506	0	1297	607	0	0
	Actinomadura	2310	0	0	0	0	0	0	0
	Actinomycetales sin clasificar	278	0	0	0	460	0	0	940
	Actinoplanes	0	0	0	207	0	0	0	586
	Agromyces	891	0	0	0	0	0	0	0
	Arthrobacter	3290	0	0	510	0	0	0	896
	Blastococcus	0	0	0	0	0	0	276	0
	Geodermatophilaceae sin clasificar	582	0	0	0	0	0	0	0
	Intrasporangiaceae sin clasificar	0	0	0	842	0	0	711	0
	Micrococcaceae sin clasificar	401	0	0	0	0	0	0	0
	Micromonosporaceae sin clasificar	408	0	0	0	0	0	0	0
	Nocardioides	0	0	0	0	593	0	0	0
	Planobispora	0	0	0	0	0	0	0	865
	Promicromonospora	0	0	0	0	0	0	1056	0
	Pseudonocardiaceae sin clasificar	0	0	0	0	0	0	584	0
	Rubrobacter	2597	0	0	0	0	0	0	0
Solirubrobacterales sin clasificar	546	0	0	0	0	0	0	0	
Streptomycetaceae sin clasificar	1955	0	0	0	0	4293	0	0	
Thermomonosporaceae sin clasificar	0	0	0	0	0	0	0	1544	
Virgisporangium	974	0	0	0	0	0	0	0	
Armatimonadetes	Armatimonadetes gp5	0	0	0	0	551	0	0	0
Bacteria sin clasificar	Bacteria sin clasificar	19562	10868	9728	18755	3338	1725	9025	1474
Bacteroidetes	Adhaeribacter	0	0	0	0	1142	0	3625	4069
	Algoriphagus	0	0	0	0	526	0	0	682
	Aureispira	0	0	0	372	0	0	0	0
	Bacteroidetes sin clasificar	226	0	2727	3743	2818	1945	282	0
	Chitinophaga	0	0	0	0	0	0	0	238
	Chitinophagaceae sin clasificar	0	0	1741	0	5637	2436	308	1910
	Chryseobacterium	0	0	0	0	147	0	0	0
	Cryomorpaceae sin clasificar	205	0	0	0	0	0	0	0
	Cytophagaceae sin clasificar	0	0	0	0	0	0	0	154
	Dyadobacter	0	0	0	0	798	0	0	0
	Flammeovirgaceae sin clasificar	0	0	853	0	348	2477	0	3812
	Flavisolibacter	0	0	0	0	1350	419	0	0
	Flavobacteriaceae sin clasificar	0	0	7988	720	12608	3889	0	1290
	Flavobacterium	136	0	1990	1425	2474	180	5420	0
	Fluviicola	0	0	0	560	0	0	0	0
	Gracilimonas	0	0	2002	0	0	349	0	0
	Lacibacter	0	0	0	0	206	0	0	0
	Niastella	0	0	0	0	0	139	0	0
	Ohtaekwangia*	769	0	0	0	3168	12074	7173	10674
	Owenweeksia	0	0	0	0	226	0	0	0
	Pedobacter	0	0	0	0	4864	265	0	0
	Pontibacter	0	0	0	0	2453	7109	0	5468
	Salinimicrobium	0	0	1993	0	0	249	0	0
	Salisaeta	0	0	785	0	0	0	0	0
	Sphingobacteriaceae sin clasificar	0	0	0	0	678	0	0	0
	Sphingobacterales sin clasificar	0	221	236	0	657	636	0	664
Terrimonas	0	0	0	0	0	936	0	0	

Tabla S6.3 Continuación

Filo	Género	Con <i>Trichoderma</i>				Sin <i>Trichoderma</i>			
		BCR	BCS	BHR	BHS	BCR	BCS	BHR	BHS
Chlamydiae	Parachlamydiaceae sin clasificar	0	0	0	0	0	0	199	0
Firmicutes	Bacillaceae 1 sin clasificar	1027	0	0	0	0	0	0	0
	Bacillaceae 2 sin clasificar	2490	0	342	0	3068	0	0	0
	Bacillales sin clasificar	8557	0	0	0	0	0	0	183
	Brevibacillus	299	0	0	0	0	0	0	0
	Clostridiales sin clasificar	0	0	0	0	732	0	0	0
	Clostridium sensu stricto	0	0	0	0	595	0	0	0
	Gracilibacillus	0	673	0	0	0	0	0	0
	Halobacillus	0	0	0	0	0	720	0	0
	Oceanobacillus	820	0	0	0	0	0	0	0
	Paenibacillus	0	0	0	0	0	337	0	0
	Pasteuria	441	0	0	0	0	258	0	0
	Peptostreptococcaceae sin clasificar	511	0	0	0	0	0	0	0
	Planococcaceae sin clasificar	1420	0	0	0	0	0	0	0
	Sporolactobacillaceae incertae sedis	0	0	0	0	1258	0	0	0
	Sporomusa	0	0	0	0	353	0	0	0
	Sporosarcina	0	0	0	0	14358	0	0	0
	Veillonellaceae genus incertae sedis	0	0	0	0	255	0	0	0
Virgibacillus	0	0	0	0	0	599	0	0	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonas	0	0	0	0	876	0	0	0
Nitospira	Nitospira	3900	3992	0	0	0	0	0	0
OD1	OD1 genus incertae sedis	0	0	203	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria sin clasificar	5240	0	991	825	683	365	1311	0
	Alteromonadaceae sin clasificar	0	0	0	0	516	0	0	0
	Amaricoccus	427	0	0	0	0	0	0	0
	Arenimonas	0	404	0	0	0	0	0	0
	Asticcacaulis	0	0	0	0	0	361	0	0
	Azospira	0	0	0	308	0	0	0	0
	Azospirillum	0	0	372	0	720	0	0	0
	Azotobacter	0	468	0	0	0	0	511	0
	Bacteriovorax	0	0	0	0	0	256	0	0
	Bdellovibrio	0	0	0	0	0	166	0	0
	Betaproteobacteria sin clasificar	1522	6186	297	8518	2719	0	1908	1126
	Brevundimonas	0	0	0	0	192	0	0	0
	Burkholderiales sin clasificar	603	0	0	0	275	428	0	0
	Cellvibrio	0	0	0	0	292	3601	0	0
	Chondromyces	0	0	0	0	0	0	551	0
	Comamonadaceae sin clasificar	0	0	0	220	3317	0	0	0
	Corallococcus	0	0	0	0	0	0	1172	1056
	Cystobacter	298	0	0	0	0	0	0	0
	Dechloromonas	0	0	0	280	0	0	0	0
	Deltaproteobacteria sin clasificar	625	0	0	0	0	0	408	0
	Desulfovibrio	0	0	0	0	190	0	0	0
	Desulfuromonadales sin clasificar	0	0	0	0	300	0	0	0
	Devosia	0	0	0	0	0	0	313	0
	Erythrobacter	0	0	0	0	0	0	0	2104
	Erythrobacteraceae sin clasificar	0	0	0	5111	0	0	0	0
	Gammaproteobacteria sin clasificar	4222	2783	4991	14142	3535	1696	3185	0
	Geobacter	0	0	0	0	991	0	0	0
	Hydrogenophaga	0	0	0	0	1959	0	0	0
	Hyphomicrobiaceae sin clasificar	2088	288	0	0	0	0	876	0
	Hyphomicrobium	0	0	0	0	0	0	618	0
	Inhella	0	0	0	0	168	0	618	0
	Luteimonas	0	0	1408	0	1316	0	0	0
	Lysobacter	0	0	1030	0	2481	0	0	0
	Magnetospirillum	0	0	0	0	191	0	0	0

Tabla S6.3 Continuación

Filo	Género	Con <i>Trichoderma</i>				Sin <i>Trichoderma</i>			
		BCR	BCS	BHR	BHS	BCR	BCS	BHR	BHS
	Mesorhizobium	0	0	0	0	0	225	0	0
	Methylobacillus	0	0	0	3120	570	0	0	0
	Methylophilaceae sin clasificar	0	0	554	0	0	0	0	0
	Methylophilus	0	0	0	0	338	0	0	0
	Myxococcales sin clasificar	0	479	0	446	179	0	0	0
	Oxalobacteraceae sin clasificar	0	0	0	0	3161	0	0	0
	Pelagibius	0	0	546	0	0	0	0	0
	Peredibacter	0	0	850	276	1112	0	0	0
	Phyllobacteriaceae sin clasificar	0	0	0	0	0	261	0	0
	Polyangiaceae sin clasificar	149	0	0	0	0	0	0	0
	Porphyrobacter	0	0	0	0	532	0	0	0
	Proteobacteria sin clasificar	2513	0	2605	626	223	297	705	409
	Pseudomonas	0	0	0	0	0	52158	0	0
	Pseudorhodoferax	0	0	0	0	535	0	0	0
	Rheinheimera	0	217	1528	409	338	0	0	0
	Rhizobiales sin clasificar	5756	2936	607	0	0	2159	0	0
	Rhodanobacter	0	0	0	0	0	188	0	0
	Rhodocyclaceae sin clasificar	0	0	0	248	0	0	0	0
	Rhodospirillales sin clasificar	2336	0	1986	0	0	0	0	0
	Skermanella	1511	0	0	0	0	0	0	0
	Sorangium	440	0	0	0	0	0	0	0
	Sphingomonadaceae sin clasificar	1211	5106	0	0	1060	0	1910	4086
	Sphingomonas	0	0	0	0	3005	0	0	0
	Sphingopyxis	0	0	0	0	348	0	0	0
	Steroidobacter	9681	0	0	0	0	177	0	0
	Vampirovibrio	0	0	0	0	0	0	0	544
	Xanthomonadaceae sin clasificar	0	0	549	0	0	542	0	429
Spirochaetes	Turneriella	0	0	0	208	0	0	0	0
Verrucomicrobia	3 genus incertae sedis	0	0	0	0	3726	280	0	0
	Luteolibacter	0	0	347	0	780	0	0	0
	Opiritaceae sin clasificar	0	0	0	0	177	432	0	0
	Opiritus	0	212	574	273	1430	605	654	0
	Spartobacteria genera incertae sedis	0	0	0	0	0	289	0	0
	Verrucomicrobia sin clasificar	0	0	0	594	499	0	352	0
	Verrucomicrobiaceae sin clasificar	0	0	0	0	287	0	653	0

*diferencias significativas teniendo en cuenta todas las muestras inoculadas con *Trichoderma* y todas las muestras sin inóculo.

+ en los casos en los que no ha sido posible determinar el género se ha clasificado con el taxón más específico

Las muestras se identifican mediante un código de 3 caracteres. La primera letra del código indica que pertenecen al bacterioma (B); la segunda, la procedencia del suelo, C: Castellà o H: Hidalgo y la tercera, la variedad de tomatera, R: resistente (Monika) o S: susceptible (Durinta).