This project is funded by the European Union

MicroWine
A Marie Curie Initial Training Network

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Tesis doctoral

Análisis de la microbiota de la vid de distintas regiones vitivinícolas y sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal

Mónica María Oyuela Aguilar

Director: Prof. Dr. Mariano Pistorio
Co-directora: Prof. Dra. Liliana Semorile

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Análisis de la microbiota de la vid de distintas regiones vitivinícolas y sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal

---

Tesista: MSc. Mónica María Oyuela Aguilar

Director/a: Prof. Dr. Mariano Pistorio

Codirector/a: Prof. Dra. Liliana Semorile

Año: 2019

El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM–UNLP-CONICET-CCT La Plata), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Profesor Dr. Mariano Pistorio y la co-dirección de la Profesora Dra. Liliana Semorile.

Dedicatoria

A mis padres, Princhi y Cherrito, quienes, con su ejemplo, esfuerzo, lucha, apoyo y amor incondicional han hecho posible cumplir mis sueños, aun cuando estos se me han visto imposibles. A mis hermanos y mejores amigos, Ramón, Loids, Eli y Cayito, quienes con sus consejos y apoyo me han mantenido siempre firme en mi camino. Finalmente, a mi sobrinito, Cori cori, que su llegada a este mundo me ha brindado un rayito de luz en esta última etapa de doctorado y lo seguirá haciendo en aquellas que están por venir.

Agradecimientos

Al programa Marie-Curie Initial Training Network de la Comunidad Europea, por haber otorgado los fondos dirigidos a la ejecución de este trabajo. A la empresa Chr. Hansen por su colaboración con este proyecto, la organización de eventos y divulgación de mi trabajo a nivel internacional. Al instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) en La Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y Aarhus Universitet en Roskilde, Dinamarca, por la infraestructura, servicios, equipos y lugar de trabajo.

Un agradecimiento especial a las bodegas que colaboraron con el material biológico en este estudio. En Argentina: Bodega Ansilta, Nohemia, Hess Family Latin Ameria S.A y, Tapiz y Patagónicas. Así como, las bodegas Caves São João, Adega Mayor y Herdade do Esporão en Portugal y Vignobles Laur en Francia.

A mi supervisor Dr. Mariano Pistorio, por haberme guiado en mi trayectoria de doctorado. Impulsándome cada vez más a destacar mis capacidades como profesional y dejándome finalmente, con muchas lecciones de vida. A mi co-directora, Dra. Liliana Semorile, por su paciencia y empeñó en que mi trabajo de tesis fuese lo mejor posible. A Flor (aka Jensen) por su tiempo, revisiones y consejos.

A mis compañeros, investigadores y demás supervisores RPS (incluyendo aquellos que ya no se encuentran hoy) por sus enseñanzas, su ejemplo y esfuerzo. Que a lo largo de estos tres años y medio me empujaron a trabajar aún más hacia el cumplimiento de mis metas. A Melisse, EmiLita, Emi, Leti, Mati, Dani, Franny, Manon, Brenda, Andrea y Esteban, que me brindaron su amistad, consejo y apoyo en esta etapa de mi vida. ¡Bienvenidos están donde sea que yo esté!

A mis compañeros Microwine, Ines, Gio, Alex, Ifigenea, Xrats, Marc, Lei, Sara, Rui, Prashy, Ingrid, Franzi, Kimmo y Taneli. Quienes aún a distancia, y a su manera, hicieron que esta etapa de mi vida fuera realmente inolvidable. ¡Hoy doy gracias de poder llamarlos amigos! (To the next Microwine meeting, “The Aftermath”).

A mi familia, el pilar y motor de mi vida, y aquellos amigos que no menciono pero que llevo siempre conmigo donde sea que esté.

Saludcitaaa

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1

I.1. La industria vitivinícola en Argentina 2
I.2. El proceso de elaboración del vino 6
I.3. Factores que influyen en la calidad del vino 8
I.4 Factores abióticos condicionantes del cultivo de la vid 9
I.4.1. Clima 9
I.4.2. Topografía 9
I.4.3. Suelo 10
I.5. Los microorganismos en el ambiente 11
I.6. Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal 16
I.6.1. Fijación de nitrógeno 16
I.6.2. Solubilización de fósforo 17
I.6.3. Producción de fitohormonas 17
I.6.4 Producción de sideróforos 18
I.7. Mecanismos de promoción indirecta del crecimiento vegetal 19
I.7.1. Control biológico 19
I.8. Análisis de comunidades microbianas 20
I.9. Significado, importancia y tipos de biodiversidad 21
I.10. Propiedades estructurales de una comunidad microbiana (índices de diversidad) 22
I.10.1. Métodos de estudio de diversidad microbiana 24
I.10.2 Estudios ómicos e implementación de herramientas de secuenciación masiva (High Throughput Sequencing, HTS) 26
I.10.3. Marcadores filogenéticos más empleados 28
I.11. Plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) 30
I.11.1. Estudio de la microbiota asociada a vid 30
I.11.2. Microbiomas y prácticas agronómicas 34
I.12 OBJETIVO GENERAL 37
I.12.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37

CAPÍTULO II. *RELACIONES ENTRE COMUNIDADES FÚNGICAS EPÍFITAS (UVAS, HOJAS Y RIZÓSFERA) DE VIDES CULTIVADAS EN DIFERENTES REGIONES VITIVINÍCOLAS* ..38

II.1. Introducción 39
II.2. Materiales y Métodos 41
II.2.1. Muestras 41
II.2.2. Preparación de muestras para extracción de DNA 42
II.2.3. Extracción de DNA 43
II.2.4. Amplificación y secuenciación de muestras de DNA 43
II.2.5. Procesamiento de datos de secuenciación 44
II.3. Resultados 46
II.3.1. Características de las regiones muestreadas 46
II. 3. 2. Análisis de datos de secuencias del espaciador ribosomal ITS1 48
II.3.3. Análisis de diversidad en comunidades fúngicas 50
II.3.4. Análisis taxonómico de comunidades fúngicas 55
II.4. Discusión 61
II.5 Material Suplementario 64

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LA RIZÓSFERA DE LA VID EN FUNCIÓN DEL AÑO DE VENDIMIA, FINCA Y CULTIVAR 66

III.1 Introducción 67
III.2. Materiales y Métodos 70
III.2.1. Toma de muestras 70
III.2.2. Preparación de muestras de rizósfera y extracción de DNA 71

III.2.3. Amplificación y secuenciación de las muestras de DNA *71*
III.2.5. Caracterización fisicoquímica de suelos *74*
III.3. RESULTADOS 74
III.3.1. Características climáticas del Valle de Ullum y propiedades fisicoquímicas de suelos *74*
III.3.2. Análisis de datos de secuenciación de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA y de la región espaciadora ribosomal ITS1 ..... *75*
III.3.3. Análisis de riqueza y diversidad en las comunidades microbianas rizosféricas *77*
III.3.4. Descripción de las comunidades microbianas *82*
III.4. DISCUSIÓN 87
III.5. MATERIAL SUPLEMENTARIO 91

CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN BACTERIAS AISLADAS DE RIZÓSFERA DE VIDES ORIGINARIAS DE DIFERENTES REGIONES VITIVINÍCOLAS DE ARGENTINA 92

VI.1. INTRODUCCIÓN 93
VI.2. MATERIALES Y MÉTODOS 95
VI.2.1. Toma de muestras rizosféricas de vid y aislamiento de bacterias *95*
IV.2.2. Identificación de aislamientos bacterianos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF *97*
IV.2.3. Ensayos in vitro de capacidades indicadoras de promoción de crecimiento vegetal por rizobacterias *97*
V.2.4. Ensayos de biocontrol in vitro contra hongos fitopatógenos *98*
IV.3. RESULTADOS 98
IV.3.1. Diversidad de bacterias cultivables halladas en las diferentes muestras *98*
IV.3.2. Análisis de propiedades relacionadas con promoción del crecimiento vegetal en los aislamientos de la colección *101*
IV.3.3. Ensayos de inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos *103*
IV.4. DISCUSIÓN 104
IV.5. MATERIAL SUPLEMENTARIO 107

V. DISCUSIÓN GENERAL 113

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 118

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I.....1

Figura I.1. Mapa de Argentina en el que se señalan las principales regiones vitivinícolas. 4
Figura I.2. Distribución mundial de los principales países productores de uva. 6
Figura I.3. Efectos metabólicos de levaduras y bacteria. 8
Figura I.4. Etapas del estudio de *metabarcoding* de DNA. 27
Figura I.5 Ubicación de la región ITS. Las regiones ITS1 e ITS2. 29
CAPITULO II.....38

Figura II.1Análisis de rarefacción para estimaciones de taxa en comunidades fúngicas 49
Figura II.2 Boxplot de valores de Riqueza (S), índices de Shannon (H') y de Simpson (1-D)..... 54
Figura II.3. Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS) de comunidades fúngicas. 55
Figura II.4. Distribución de filos en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera. 56
Figura II.5 Distribución de comunidades fúngicas en la categoría de Clase. 57
Figura II.6 Abundancia relativa de clases fúngicas en uvas, hojas y rizósfera, según varietal vínico. 58
Figura II.7. Diagrama de Venn mostrando la cantidad de OTUs fúngicas compartidas 59
Figura II.8. Diagrama de Venn indicando cantidad de OTUs compartidas entre cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon. 60
Figura II.9. Análisis de Escalamiento Multidimensional no-Métrico (NMDS) aplicando distancia de similitud de Bray-Curtis para clases fúngicas en uvas, hojas y rizósfera. 60
Figura II.S1. Esquema de toma de muestras 64
CAPÍTULO III.....66
Figura III. 2. Análisis de Componentes Principales (PCA). 76
Figura III. 3. Análisis de rarefacción de estimaciones de Riqueza 77
Figura III. 4. Comparación entre Riqueza (S) e Índice Chao1..... 79
Figura III. 5. Boxplot de valores de Riqueza e Índice de Shannon por año. 79
Figura III.6. Análisis de Escalamiento Multidimensional no-métrico (NMDS) de comunidades eucariotas. 81
Figura III.7. Análisis de Escalamiento Multidimensional no-métrico (NMDS) de comunidades procariotas..... 81
Figura III.8. Promedio de abundancia relativa de los Filos Fúngicos dominantes en cada tipo de muestra.. 82
Figura III.9. Diagrama de Venn señalando géneros fúngicos compartidos.. 83
Figura III.10. Abundancia relativa promedio de filos procariotas dominantes en cada muestra..... 84
Figura III.11. Promedio de abundancia relativa de *Proteobacterias* según año de muestreo.. 85
Figura III.12**.** Diagrama de Venn que indica número de OTUs procariotas. 86
Figura III.13. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) de la comunidad fúngica. 86
Figura III.14. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) de la comunidad procariota..... 87
CAPÍTULO IV.....92
Figura IV.1. Porcentaje de aislamientos por sitio de muestreo y región.. 99

Figura IV.2. Asignación de géneros (UV MALDI-TOF) MS. 100
Figura IV.3**.** Evaluación *in vitro* de caracteres asociados a la promoción del crecimiento vegetal. 101
Figura IV.S1. Distribución de géneros bacterianos, identificados por UV-MALDI-TOF.....107

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II.....38

Tabla II.1 Origen y denominación de las muestras colectadas. 49
Tabla II.2 Valores de Riqueza en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera. 51
Tabla II.3 Valores de índice de Shannon en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera. 52
Tabla II.4 Valores de índice de Simpson en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera. 53
Tabla II.S1. Resumen de datos de secuenciación de la región ITS1 en muestras de vides.....64

CAPÍTULO III.....66

Tabla III. 1. Sitios de toma de muestras, ubicación y varietal..... 70
Tabla III. 2. Propiedades fisicoquímicas de suelos rizosféricos de viñedos..... 75
Tabla III.3. Riqueza y diversidad del microbioma de rizósfera basado en datos de secuenciación de comunidades procariotas (región V3-V4 del gen *16S rRNA*) y fúngicas (espaciador ITS1). 78
Tabla III.S1. *Resumen de datos obtenidos del procesamiento de resultados de secuenciación ITS1 y V3-V4 16S rRNA*.....91

CAPÍTULO IV 92

Tabla IV. 1. Sitios de muestreo para la obtención de la colección de aislamientos. 96
Tabla IV. 2. Actividad/es promotora/s del crecimiento vegetal asociada/s a los géneros bacterianos identificados en rizósfera de vid. 102
Tabla IV. 3. Inhibición de hongos fitopatógenos por aislamientos del género *Bacillus*. 104
Tabla IV.S1. Identificación de aislamientos mediante MALDI-TOF y propiedades promotoras del crecimiento vegetal.....108

Capítulo I. Introducción

I.1. La industria vitivinícola en Argentina

La vitivinicultura como actividad económica y el vino como producto cultural han acompañado al hombre desde tiempos inmemoriales. El vino es una bebida especial, ya que posee dimensiones culturales, sociales y económicas, y ha ocupado un lugar de preeminencia en la vida cotidiana de las generaciones que habitaron nuestro Planeta. También es una bebida de uso religioso, empleada en las festividades griegas y romanas, y en las ceremonias cristianas. Durante milenios el vino ha curado heridas, aliviado dolores y asegurado el no contagio de enfermedades trasmitidas por aguas contaminadas. El vino es también colonizador. Quien se dedica al cultivo de la vid se arraiga y crea cultura. Las viñas y las bodegas no emigran según las vicisitudes de la economía; son capitales que apuestan necesariamente al futuro, porque en la edad encuentran la bonanza y la calidad de las uvas.

Las primeras vides aptas para vinificación llegaron a América con Colón, en su segundo viaje, pero no prosperaron en el Caribe a causa del clima. Con la expansión colonizadora por el continente, y hacia 1543, las vides ingresaron a la que luego sería la ciudad de Salta, a la zona de Cafayate, provenientes del Alto Perú. En 1556 el clérigo Juan Cedrón, procedente de La Serena (Chile), provisto de estacas de vid (de cepas Moscatel y Uva País, origen España) y semillas de algodón, se instaló en Santiago del Estero y elaboró los primeros vinos nacionales para celebrar misa. Es decir, que la producción de vino en Argentina estuvo originalmente vinculada a la liturgia del catolicismo más que a una actividad comercial y, por ello, encontró en las órdenes religiosas a sus primeros hacedores (Fondo Vitivinicola de Mendoza, 2009).

En 1561, cuando Pedro del Castillo realizó la expedición fundadora de Mendoza, llevó con él vides, y lo mismo hizo Juan Jufré un año después, al fundar San Juan, en plena colonización de las tribus huarpes (o warpes), nativas de la región cuyana. La historia de las viñas y las bodegas en Argentina se entrelaza con la propia historia de Mendoza y San Juan. Entenderla significa comprender su historia política, económica y de relaciones sociales. La vitivinicultura fue capaz de producir la gran movilidad social –casi única- ocurrida en Mendoza y San Juan a principios del siglo XX: cientos de "gringos" llegados en el ferrocarril ascendieron, en pocos años, de contratistas a viñateros, o de ignotos a reconocidos industriales bodegueros o metalúrgicos. Muchos actores sociales contribuyeron al desarrollo de esta labor, monjes, criollos e

inmigrantes. El agrónomo francés Michel A. Pouget, Director de la Quinta Normal de Agricultura (Mendoza, 1853), el agrónomo ruso Aarón Pavlovsky, Director de la Escuela de Agricultura (Mendoza, 1884), el padre saleciano Francisco Oreglia, fundador de la Escuela de Enología Don Bosco, representan a algunos de los grandes hacedores de la vitivinicultura nacional, que junto a cientos de enólogos o simplemente "prácticos" hicieron posible que la actividad vitivinícola cuyana se convierta en lo que es hoy, una industria de 500 años (Fondo Vitivinicola de Mendoza, 2009; Lacoste, 2003).

La región apta para el cultivo de la vid en Argentina se extiende a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde los 22º hasta los 42º de latitud sur. La gran amplitud latitudinal, combinada con la topografía de los valles andinos, condicionan grandes variaciones ecológicas que permiten cultivar una amplia gama de cepas. Se trata, en general, de zonas con inviernos bien marcados, veranos calurosos y buena insolación. La baja precipitación obliga al riego artificial, a partir de ríos o aguas subterráneas, configurando así verdaderos oasis perfectamente delimitados y separados. Fundamentalmente se trata de una viticultura de oasis de altura, con pendientes que oscilan entre valores cercanos al 2%, en las regiones de pie de monte, hasta alrededor de 0,2%, en las regiones más planas; y prácticamente no existen viñedos en las laderas de las montañas. La altitud de las viñas oscila entre los 450 y los 1800 m sobre el nivel del mar.

La Figura I.1. muestra las principales regiones vitivinícolas de Argentina. La superficie sembrada con vides alcanzó, al 31 de diciembre de 2018, las 218.233 ha (INV, 2018), superando en un 8,5% al área cultivada en el 2000. Sin embargo, la cantidad de viñedos inscriptos en el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) es menor, ya que actualmente existen 23.931, es decir, 1249 menos que en 2000. La tendencia indica que las fincas son cada vez más grandes; el tamaño promedio en 1990 era de 5,8 ha, en 2000 de 8,0 ha y en 2018 de 9,1 ha (INV, 2018). De las 23 provincias que componen territorialmente al país, 18 registran superficie cultivada con vides. El 70,1% del total corresponde a Mendoza, el 21,4% a San Juan, el 3,6% a La Rioja, el 1,5% a Salta, el 1,3% a Catamarca, el 0,8% a Neuquén y el 0,7% a Río Negro, siendo estas 7 provincias las que concentran la mayor superficie cultivada. El 0,5% restante se distribuye entre 11 provincias: Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Tucumán, San Luis, Chubut, Entre Ríos, Jujuy, Misiones, Santiago del Estero y Santa Fe. Desde 2008, se ha registrado una disminución en la superficie

cultivada con vides en las 3 provincias más importantes, y también en Río Negro. No obstante, creció en otras provincias, principalmente en Salta, seguida por Catamarca y Neuquén.

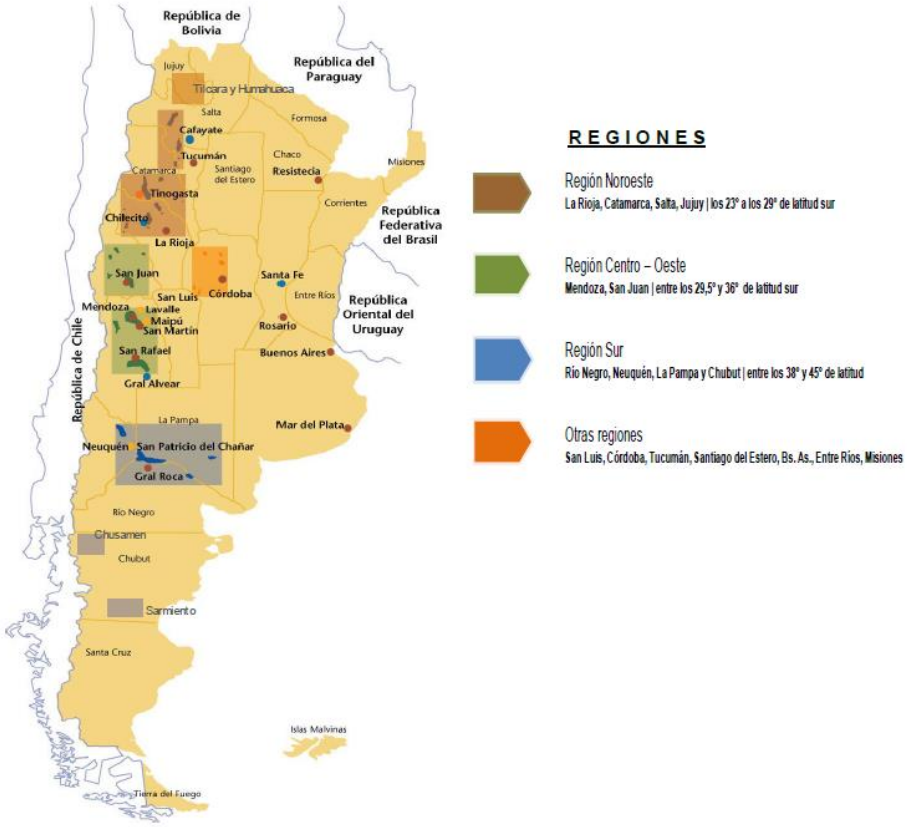

Figura I.1. Mapa de Argentina en el que se señalan las principales regiones vitivinícolas (INV, 2018).

Los datos estadísticos correspondientes a la producción vitivinícola argentina, para la vendimia 2018, son los siguientes: cosecha de uvas 25.733.114 quintales (1 qq = 0,1 t), elaboración de vinos 14.521.510 hl, elaboración de mostos 4.772.867 hl y elaboración de jugo de uva 1.631 hl (INV, 2019). El mercado interno representa el 80% de la comercialización del vino argentino, y viene disminuyendo desde hace tres décadas, con el avance de la cerveza en la preferencia de los consumidores, constituyendo ésta la principal problemática para el sector (Ministerio de Hacienda de la Nación, 2018). En el comercio exterior, 20% de las ventas, Argentina viene perdiendo mercados desde 2011, vinculado tanto a aspectos macroeconómicos (atraso del tipo de cambio e incremento de costos internos), como al avance de ciertos competidores –Australia y Chile- que acceden a los principales mercados en condiciones

preferenciales. Sin embargo, si se comparan las exportaciones de vino fraccionado entre febrero 2019 y febrero 2018, la variación porcentual 19/18 resultó de +9,5%, y en las de vino a granel, de +171,0% (Departamento de Estadísticas y Estudios de Mercados, 2019).

Con relación a las variables vitivinícolas, Argentina es el 5º productor mundial de vino (Italia, Francia, España y Estados Unidos son los cuatro primeros) (Figura I.2), el 7º en superficie cultivada y producción de uva, el 8º en consumo y el 10º como exportador (OIV, 2018). Es decir que, en relación a la caracterización vitivinícola, Argentina se ubica entre los top 10 del planeta. El excelente trabajo que viene realizando la industria vitivinícola argentina ha logrado instalar y referenciar la imagen del vino argentino en el mundo por sus particularidades, perfiles regionales y varietales y calidad, con el Malbec como emblema destacado.

Durante los últimos treinta años se produjeron importantes cambios en la industria y en la comercialización del vino, entre los que se destacan la enorme competencia internacional y un mercado nacional con sobreoferta. La necesidad de atraer al consumidor resulta de vital importancia para cualquier empresa vitivinícola, buscando elementos diferenciadores de sus productos como herramienta eficaz para distinguirse de sus competidores. Con este propósito, las bodegas han ido introduciendo modificaciones tecnológicas en la elaboración de los vinos, han recuperado variedades de uvas autóctonas de la zona y han comenzado a reemplazar los cultivos comerciales de levaduras por levaduras indígenas, específicas de cada región vitivinícola, para obtener vinos distintivos, que aporten nuevas sensaciones a un consumidor cada vez más exigente.

El concepto de *terroir* reviste suma importancia en vitivinicultura, ya que relaciona los atributos sensoriales del vino con las condiciones ambientales de la parcela del viñedo. Según la OIV, el *terroir* se define como la interacción colectiva entre los factores físicos y biológicos ambientales identificables de un área, que, en conjunto con las prácticas vitivinícolas, proveen características distintivas a los productos originarios de ese lugar (Resolution OIV/Viti 333/2010). Se trata de un ecosistema interactivo en un determinado ambiente, que incluye clima, geología, geomorfología, suelo y planta (Gilbert et al., 2014; Zarraonaindia et al., 2015; Bokulich et al., 2016), así como las técnicas locales de viticultura y vinificación. Por tanto, la calidad y la singularidad de un vino estarán determinadas por la uva y sus procesos de maduración, dependientes

de la interrelación clima – suelo – planta y por las modificaciones impuestas por las prácticas vitivinícolas aplicadas. Es decir que, el concepto de *terroir* concierne a un amplio rango de parámetros analíticos que constituyen las bases de la enología del conocimiento. En este sentido, los aspectos biológicos de los suelos resultaron subestimados durante años, pese a poseer una gran diversidad microbiana. La microbiota asociada al suelo se ha descripto como determinante no sólo de las propiedades químicas y nutricionales del mismo, sino también de la sanidad, rendimiento y calidad de la uva (Belda et al., 2017). Trabajos recientes describen al microbioma de suelo como reservorio de la microbiota asociada a las uvas, y como contribuyente de las propiedades sensoriales finales de los vinos (Zarraonaindia et al., 2015; Bokulich et al., 2016). Para una mejor comprensión de los roles cruciales de los microorganismos en el proceso completo de elaboración del vino, se deben conocer sus nichos ecológicos, su dinámica poblacional, y las relaciones "microbioma – sanidad de la vid" y "microbioma – metaboloma del vino" (Belda et al., 2017). En conclusión, el *terroir* constituye un aspecto sustancial de aceptación del consumidor, de identidad y de apreciación económica en la producción de vinos y resulta de suma importancia estudiar los factores que contribuyen al mismo.

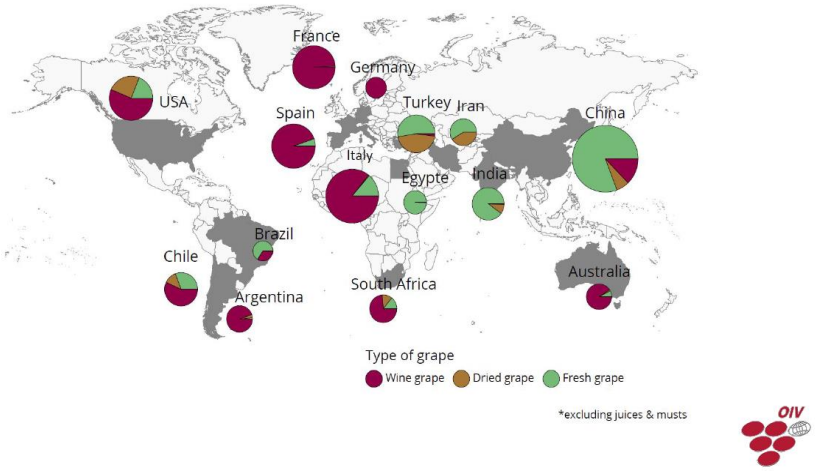

Figura I.2. Distribución mundial de los principales países productores de uva (OIV, 2017).

I.2. El proceso de elaboración del vino

El vino es una mezcla compleja especial de química, biología y cultivo, donde los microorganismos juegan un rol crítico. Es una bebida fermentada a

base de mosto (jugo de uva), que se convierte en vino mediante la fermentación alcohólica (FA), conducida por levaduras, principalmente *sacaromicéticas* pero también no-*sacaromicéticas*, la cual conlleva varios procesos bioquímicos que convierten los azúcares iniciales, glucosa y fructosa, en etanol y CO_2. A su vez, el metabolismo de los aminoácidos y la descomposición de azúcares mediante otras rutas metabólicas, genera metabolitos secundarios que contribuyen al aroma y sabor del vino (Ciani et al., 2009; Cheng et al., 2015). En general, los compuestos volátiles derivados de esta primera fermentación (alcoholes y ésteres) constituyen el mayor porcentaje de la composición aromática de un vino. Las levaduras también son capaces de liberar, mediante simples reacciones enzimáticas, compuestos que impactan en el aroma del vino, tales como terpenoles o tioles varietales (Belda et al., 2017b).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) constituyen uno de los grupos de microorganismos más relevantes en vinificación, por ser responsables de la decarboxilación del ácido L-málico a ácido L-láctico, mediante un proceso conocido como fermentación maloláctica (FML) que, en general, ocurre luego de la FA. La FML es un proceso requerido en vinos tintos, y en algunos blancos, dado que los convierte en más agradables al paladar debido a su deacidificación e incremento del pH, además de contribuir a la estabilidad microbiana (remoción del ácido L-málico como fuente de carbono) y a la modificación del perfil aromático (liberación de diacetilo y otros compuestos carbonílicos a partir de ácido cítrico, que contribuyen al aroma mantecoso del vino), ligado a las actividades enzimáticas de las BAL (Henick-Kling & Stoewsand, 1993; Maicas & Gonz, 1999; Ugliano et al., 2003; Lerm et al., 2010). *Oenococcus oeni* es la típica especie bacteriana aislada de procesos espontáneos de FML, si bien algunos *Lactobacillus*, y en particular la especie *Lactobacillus plantarum*, han mostrado ser adecuadas para conducir esta fermentación secundaria (Henick-Kling & Stoewsand, 1993; Maicas & Gonz, 1999; Ugliano et al., 2003; Lerm et al., 2010)(Figura I.3).

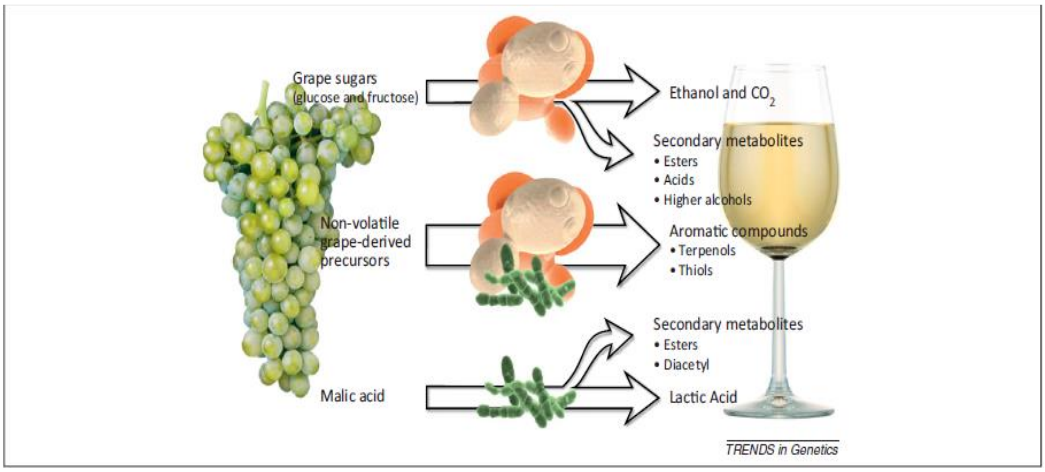

Figura I.3. Efectos metabólicos de levaduras y bacterias en ambos procesos fermentativos (FA y FML) durante la elaboración de vino, a partir de mosto de uva (Borneman et al., 2013).

I.3. Factores que influyen en la calidad del vino

La calidad de un vino no sólo depende de los procesos fermentativos desarrollados en bodega, sino también de un conjunto de factores ambientales y biológicos que ocurren en el viñedo. La vid, como otras especies vegetales, muestra variaciones en sus caracteres morfológicos y fisiológicos según las condiciones del ambiente en el que vive, donde inciden factores de diversa naturaleza que condicionan su desarrollo. La industria vitivinícola reconoce la calidad de un vino por su potencial de expresión de la región de origen; término mejor identificado como *terroir*. Como se mencionó, la definición de *terroir* incluye la especificidad del suelo, la topografía, el clima, las características del paisaje y los factores de biodiversidad. En este sentido, y a partir de las nuevas exigencias de calidad y las demandas del mercado vitivinícola, surge la necesidad de mejorar las prácticas agrícolas y las enológicas de modo que su implementación conduzca a una mejor expresión del *terroir* en los vinos producidos. La investigación del *terroir* persigue actualmente dos objetivos: i- descifrar los ciclos biogeoquímicos de macro y micronutrientes, distintivos biológicos y químicos del *terroir* (ej., enfoque metagenómico y huellas digitales regionales) y ii- efectuar el denominado "*terroir* zoning", aplicando tecnologías geoespaciales (monitoreo de calidad de suelo y de gestión de manejo del cultivo para optimizar su calidad)(Vaudour et al., 2015). La perspectiva de facilitar el control del *terroir* espacial plantea otro gran desafío, la sustentabilidad del

terroir y la construcción de estrategias de manejo eficiente de la relación suelo/viticultura, que puedan aplicarse y evaluarse a diferentes escalas (Vaudour et al., 2015).

I.4 Factores abióticos condicionantes del cultivo de la vid

I.4.1. Clima

Como todo cultivo agrícola, la vid posee limitantes, ya que su productividad y calidad se circunscriben a determinadas condiciones ambientales, siendo la más restrictiva el clima. Para cereales como maíz, trigo o soja, el clima permite su cultivo en un amplio rango geográfico, en tanto para café, cacao y vid, este rango se reduce (Jones & Schultz, 2016). Lograr que los racimos de una vid adquieran la perfección y armonía deseables para obtener un producto de calidad, requiere de un clima óptimo y de prácticas agrícolas adaptadas a ese clima; sin embargo, no resulta fácil, ya que la relación clima/producción/calidad difiere para cada variedad de uva.

La producción de *Vitis vinifera* L. se implementó en numerosas regiones del mundo, y el verdadero desafío consiste en producir uvas de calidad óptima para vinificación. Significa que alcancen los niveles de azúcares que soporten grados óptimos de alcohol, cierto grado de acidez, y determinada cantidad de compuestos fenólicos responsables del color, entre otros aspectos (Mozell & Thachn, 2014). El cultivo de la vid es típico de regiones mediterráneas. No obstante, el cambio climático ha comenzado a generar efectos drásticos que, según las predicciones, impactarían en el ecosistema de viñedos de dichas áreas geográficas (Hannah et al., 2013). Por esta razón, la viticultura se está expandiendo hacia regiones de climas fríos, pese al incremento en los costos de producción, la elevada variabilidad climática, y la vulnerabilidad de la vid a enfermedades (Anderson, 2017).

I.4.2. Topografía

Los elementos topográficos representan otro aspecto que influye en la vitivinicultura. El relieve del terreno conlleva la adaptación de los viñedos a la altitud, grado de inclinación y exposición solar. La altitud juega un papel importante en la selección del sitio y en la variedad de uva a cultivar. De igual forma, el grado de inclinación del terreno posiciona al viñedo en dirección Norte/Sur o viceversa, afectando la cantidad de UV disponible (luz solar), el

grado de erosión del suelo, el nivel de drenaje del agua y el microclima de la canopia de la vid (Fraga et al., 2014). El relieve topográfico también puede afectar la composición de la materia orgánica del suelo, a través de su erosión (Bergstrom et al., 2001). Esto constituye otro factor determinante en la implementación de ciertas prácticas vitícolas, repercutiendo en las características del suelo y modulando el sistema radicular de las plantas, así como la estructura de su microbioma.

I.4.3. Suelo

El suelo constituye el sustento de las plantas, su reservorio de agua y nutrientes y el regulador de los elementos climáticos (ej., temperatura y precipitación) que actúan sobre las mismas. Constituye uno de los aspectos determinantes del *terroir*, por su contacto con el sistema radicular, siendo responsable directo de los factores de crecimiento que permiten condiciones fisiológicas y de rendimiento favorables (Guerra & Steenwerth, 2012). Así, vides bajo las mismas condiciones climáticas pueden presentar diferente vigor en función de la variabilidad del suelo.

El suelo se estudia a través de su perfil, analizando una sección o corte vertical que incluya todas las capas que hayan sido alteradas en el curso de su formación. Las capas se denominan horizontes y cada una se individualiza por sus propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas, mineralógicas, biológicas y estructurales. Un mismo suelo puede tener varias texturas o varios contenidos en materia orgánica, dependiendo de sus horizontes.

El objetivo de un análisis de suelo consiste en caracterizar la unidad taxonómica (tipo de suelo) mediante una descripción *macromorfológica* completa de sus propiedades visibles y medibles en el campo y una descripción *micromorfológica*, de cuantificación de propiedades medibles en el laboratorio. La proporción de componentes determina las propiedades físicas y mecánicas del suelo: textura, estructura, color, permeabilidad, porosidad, drenaje, consistencia, profundidad efectiva. Por ejemplo, la textura de un suelo, determinada por la proporción de tamaños de partículas que lo constituyen, influye en la facilidad de abastecimiento de nutrientes, agua y aire, fundamentales para la vida de las plantas. Se ha corroborado que el contenido de arcilla de un suelo puede limitar la absorción y retención del agua, y reducir

el acceso de las raíces a profundidades donde podrían obtener más nutrientes (Fraga et al., 2014).

La buena gestión del suelo de un viñedo implica considerar distintos aspectos: control de hierbas, conservación y mejora de nutrientes, gestión del agua, optimización de la biodiversidad respecto al buen manejo de plagas y preservación de insectos benéficos (Guerra & Steenwerth, 2012). La buena gestión del suelo repercute en la calidad del vino producido, y la diversidad microbiana del mismo resulta esencial para el óptimo funcionamiento del ecosistema (Bissett *et al.* 2007; Brussaard *et al.* 2007).

Los microorganismos del suelo desarrollan parte de los ciclos biogeoquímicos, de descomposición de la materia orgánica y de flujo de energía, de ahí su importancia en las funciones ecológicas del mismo (Doran & Zeiss, 2000; Sotomayor-Ramírez et al., 2009; Shi et al., 2013). La protección de la diversidad microbiana contribuye, en gran medida, a la sustentabilidad del suelo y a la reducción de riesgos y degradación de los ecosistemas (Wasaki et al., 2005). Las comunidades microbianas son sensibles a los cambios generados por ciertas prácticas agrícolas, tales como sistema de cultivo, labranza, riego, fertilización, aplicación de plaguicidas, intensidad de producción, homogeneidad de sistemas agrícolas y factores ambientales (Doran & Zeiss, 2000; Chaparro et al., 2012; Shi et al., 2013; Chen et al., 2016). También pueden verse afectadas por factores como propiedades fisicoquímicas del suelo, identidad de especies vegetales con que interactúan, clima y su variabilidad temporal, características geográficas del sitio, prácticas agrícolas y forestales. Comprender la dinámica de cambio de las comunidades microbianas en ambientes naturales y antrópicos resulta clave para diseñar estrategias productivas en equilibrio con el ambiente.

I.5. Los microorganismos en el ambiente

El planeta Tierra contiene una enorme diversidad microbiana constituida por organismos procariotas, hongos, protozoos, algas y virus, que conforman la mayoría de la biomasa terrestre. Al conjunto de microorganismos que habita determinado ambiente se lo define como microbiota (Robinson et al., 2010). La actividad y diversidad de la microbiota constituyen algunos de los condicionantes de la fertilidad, estabilidad y funcionamiento de ecosistemas y agroecosistemas. La diversidad microbiana resulta esencial para garantizar los

ciclos de nutrientes y los procesos de descomposición del material orgánico, mediante procesos de oxidación, reducción, degradación y mineralización, así como por interacciones inter e intra-específicas reguladas por los microorganismos que habitan un nicho ecológico. Profundizar el conocimiento de la diversidad microbiana constituye una línea de investigación relevante para comprender el funcionamiento de los ecosistemas y de los diferentes procesos que ocurren en los mismos (López-Reyes et al. 2015; Acinas, 2007; Cadena-Zamudio & Martínez-Peña, 2016).

Los procariotas (bacterias y arqueas) son componentes esenciales de la microbiota terrestre, y catalizan transformaciones únicas e indispensables en los ciclos biogeoquímicos de la biósfera. Constituyen gran parte de la diversidad genética del planeta; se estima la existencia de 4 a 6 x 10^{30} células procariotas en la biósfera terrestre, ubicadas principalmente en la sub-superficie terrestre (0,25 - 2,5 x 10^{30} células), en la sub-superficie oceánica (3,5 x 10^{30} células), en el suelo (2,6 x 10^{29} células) y en las aguas oceánicas (1,2 x 10^{29} células) (Whitman et al., 2007).Respecto a la diversidad bacteriana, se ha reportado que 1 tonelada de suelo puede contener hasta 4 x 10^{6} taxas diferentes (Curtis, Sloan, & Scannell, 2002), evidenciando así su importancia. En relación a los hongos, los mismos impactan en procesos fundamentales del suelo, como descomposición, agregación, liberación y almacenamiento de nutrientes (Christensen, 1989)**.** Las levaduras, hongos con forma unicelular predominante en su ciclo de vida, se han detectado en suelos de todo el mundo (Vishniac, 2006; Botha, 2011)**,** si bien su relevancia en el funcionamiento del mismo no está bien dilucidada. Las levaduras influyen en la agregación del suelo, contribuyen a los ciclos de nutrientes e interactúan con la vegetación (Cloete et al., 2009). Si bien se han estudiado durante más de un siglo (Botha, 2011; Masinova et al., 2017), poco se conoce aún sobre su diversidad, habiéndose reportado unas 130 especies en suelos de diferentes regiones del mundo.

Los microorganismos establecen asociaciones complejas y dinámicas con las plantas, que varían entre las mutuamente beneficiosas y el comensalismo o las patogénicas (Raaijmakers et al., 2009; Newton et al., 2010). Las asociaciones planta-microorganismo ejercen un papel clave en la calidad del suelo y en la productividad y sanidad de las plantas, a través de mecanismos directos o indirectos, como mineralización de la materia orgánica, activación de mecanismos vegetales de defensa, y producción de antibióticos contra

fitopatógenos (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Compant et al., 2010; Bhattacharyya & Jha, 2012; Souza et al., 2015; Pérez-Portuond et al., 2017). Al grupo de bacterias capaces de desarrollar relaciones benéficas con plantas se lo conoce como *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal* (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - PGPR). Las PGPR pueden colonizar tanto la superficie de plantas (epífitas) como su interior (endófitas). El empleo de PGPR conduce al sustento de una adecuada nutrición vegetal y a la reducción de efectos ambientales negativos como fertilizantes químicos. La rizósfera (tierra que rodea las raíces vegetales) es el origen más probable de muchos de estos organismos. El concepto rizósfera involucra tanto al suelo influenciado por el sistema radicular de plantas y tejidos de la raíz como al suelo que rodea este sistema, donde las propiedades físicas, químicas y biológicas pueden variar, modificadas por el crecimiento y la actividad radicular (Antoun & Prevost, 2006). La rizósfera puede contener hasta 10^{11} células microbianas/gramo raíz (Egamberdieva et al., 2008; Zhang et al., 2019) y más de 30.000 especies procariotas, cuya mayoría aporta funciones benéficas para la productividad de la planta (Mendes et al., 2013). La rizósfera se subdivide en tres zonas básicas: endorizósfera, que consiste en el tejido de la raíz, incluyendo la endodermis y capas corticales; el rizoplano, que es la superficie de la raíz a la que se adhieren las partículas del suelo y los microbios (formada por la epidermis, la corteza y la capa de polisacáridos), y la ectorizósfera, o porción más externa, consistente en el suelo inmediatamente adyacente a la raíz (Prashar et al., 2013). Las raíces de las plantas liberan al ambiente, por exudación, secreción y deposición, gran variedad de compuestos orgánicos que convierten a la rizósfera en una zona con mayor concentración de nutrientes que el seno del suelo. Este hecho promueve un mayor número de poblaciones microbianas activas en la zona radicular (Grayston et al., 1996), fenómeno conocido como efecto rizosférico (Antoun & Prévost, 2006). Estos microorganismos estimulan el crecimiento vegetal por diferentes mecanismos, como fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), producción de fitohormonas, disponibilidad de minerales y control de fitopatógenos. Algunas PGPR impulsan el desarrollo de la raíz (Mantelin & Touraine, 2004), alterando su arquitectura por acción de fitohormonas, como el ácido indol acético, resultando en un incremento del área superficial y del número de pelos radiculares. Esta estimulación favorece la defensa de la planta frente a patógenos y se relaciona con la tolerancia inducida al estrés. Las ventajas otorgadas por las PGPR a las plantas hacen cada vez más frecuente la

inoculación del suelo con las mismas, con el fin de incrementar la productividad de los cultivos.

La estructura de la comunidad bacteriana de rizósfera está influenciada por factores bióticos y abióticos. Las interacciones PGPR-planta son complejas y dependen del tipo de planta y de suelo. Las raíces influyen en la estructura de la comunidad microbiana de rizósfera, a través de su morfología y del enriquecimiento selectivo del medio por sus exudados (Berg & Smalla, 2009). Los genotipos vegetales juegan también un rol importante en la interacción planta-microorganismos benéficos, como se ha demostrado a través de la respuesta de diferentes cultivares a un mismo organismo inoculado. La inoculación con PGPR afecta la colonización de las raíces, el tamaño de población de comunidades microbianas sobre la superficie de la planta y la composición de dichas comunidades (Smith & Goodman, 1999). La etapa del desarrollo de la planta también cumple un papel crítico en la estructura de la comunidad rizosférica. La rizósfera de una planta joven está habitada, principalmente, por especies bacterianas con tasas de crecimiento rápido, que utilizan sustratos simples proporcionados por rizodeposición (Brimecombe et al., 2001). El envejecimiento vegetal produce un desplazamiento hacia comunidades bacterianas con menores tasas de crecimiento y con capacidades para degradar sustratos más complejos. En un estudio comparativo de diversidad de especies bacterianas del género *Pseudomonas*, en lino y tomate, se halló que las poblaciones aisladas de suelos no cultivados diferían de las aisladas de plantas (rizósfera, rizoplano o tejido de la raíz). El análisis de los aislamientos mostró que la planta es capaz de seleccionar las especies del género *Pseudomonas* y que dicha selección resultó más evidente en lino que en tomate (Lemanceau et al., 1995). Otro estudio de diversidad bacteriana en rizósfera de frutilla (*Fragaria ananassa*), de colza (*Brassica napus* L.) y de papa (*Solanum tuberosum*) mostró cambios dependientes de la planta, en relación a la abundancia relativa de poblaciones, que resultaron más pronunciados en el segundo año de crecimiento del cultivo (Smalla et al., 2001). Los patrones de comunidades rizosféricas de plantas anuales de colza y papa fueron similares, pero diferentes del patrón de la planta perenne de frutilla.

El suelo afecta a las poblaciones microbianas a través de efectos directos y/o indirectos sobre su crecimiento y el de la planta hospedadora. Entre ellos, sus propiedades fisicoquímicas (pH, humedad y disponibilidad de agua,

salinidad, textura, materia orgánica, etc.) y la presencia o ausencia de pesticidas y otras sustancias xenobióticas. Estos factores abióticos también influyen directamente en la actividad de las PGPR y, probablemente, en su efecto sobre el crecimiento vegetal y la dinámica de las comunidades microbianas de raíz (Antoun & Prévost, 2006). Los tipos bacterianos predominantes en rizósfera son aquéllos que resultaron colonizadores eficientes de raíz. Entre los hongos, los micorrízicos constituyen un grupo importante para una agricultura sustentable. Desarrollan asociaciones distinguibles según su morfología y de acuerdo a la planta y hongo involucrados. Se clasifican en ectomicorrizas y endomicorrizas; entre estas últimas, la micorrícico-arbuscular es la más distribuida, ya que un 80% de las especies de plantas vasculares terrestres presentan micorrizas arbusculares asociadas (Qiu et al., 2006; Lee et al., 2013). A través de esta asociación, los hongos facilitan la absorción de nutrientes minerales del suelo a cambio del carbono asimilado por las plantas (Smith & Read, 2008). Se trata de hongos biotrofos obligados, miembros del orden *Glomerales*, considerados como el grupo más antiguo de organismos que viven en simbiosis con plantas terrestres (Redecker et al., 2000)**.** Se considera que esta relación simbiótica se estableció hace unos 460 millones de años y habría desempeñado un rol importante en el establecimiento de las plantas en el suelo (Redecker et al., 2000). Producen estructuras muy ramificadas, llamadas arbúsculos, donde el hongo crece en el interior de la raíz, entre la pared y la membrana celular de células de la corteza radicular. Así, el hongo puede absorber nutrientes del suelo (especialmente P) que luego transporta a la raíz, a través de las hifas (Smith & Read, 2008). Otras funciones asociadas con la respuesta de las plantas a la colonización por hongos micorrícicos arbusculares jugarían potenciales roles en la determinación de la diversidad vegetal, la variabilidad de los ecosistemas y la productividad (Munkvold et al., 2004; Smith et al., 2004)**.**

Como se mencionó, la rizósfera es un sitio de elevada actividad microbiana y estudios recientes indican que la micorrizósfera también lo es, y que las bacterias de suelo pueden asociarse a la región extra-radical de las hifas (Toljander et al., 2006; Jansa et al., 2013). Asimismo, se ha descripto la influencia de los hongos micorrícicos arbusculares en la composición de la comunidad bacteriana, tanto *in vivo* como *in vitro*.Marschner et al. (2001) analizaron de qué modo la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares modificaba la composición de la comunidad rizosférica de plantas de maíz.

Describieron diferencias en las comunidades bacterianas de plantas micorrizadas y no micorrizadas, y señalaron que estas diferencias aumentaban si los ensayos se prolongaban en el tiempo. Toljander et al. (2007) demostraron que los exudados de hongos micorrícicos arbusculares tenían efecto directo sobre la comunidad bacteriana del suelo. Ordoñes et al. (2016) analizaron la relación entre bacterias solubilizadoras de P y hongos micorrícicos arbusculares y describieron los efectos sobre el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y de estas últimas sobre el crecimiento de hifas extra-radiculares, en raíces de zanahoria y de papa. Estos resultados demuestran que ambos grupos de microorganismos de rizósfera interactúan entre sí (Ordoñes et al., 2016).

I.6. Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal

I.6.1. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento esencial que conforma gran parte de las macromoléculas celulares. El N_2 molecular, es también el componente mayoritario de la atmósfera; es inerte y no aprovechable directamente por la mayoría de los seres vivos. La fijación de N puede ocurrir de manera abiótica (sin intervención de seres vivos) o por acción de microorganismos (fijación biológica de N, FBN). La FBN es un proceso muy importante que permite reducir considerables cantidades de N atmosférico, y está presente en diferentes taxa de bacterias y arqueas, mejor conocidas como diazótrofos (Saharan & Nehra, 2011). El 80% de la FBN la llevan a cabo organismos diazótrofos en simbiosis con legumbres, a los que se conoce como rizobios.

Los rizobios habitantes del suelo, *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, poseen capacidad de asociarse en simbiosis con raíces de leguminosas y fijar N_2 atmosférico, al que convierten en amonio. El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de comunicación y diferenciación entre ambos organismos simbiontes, que dan lugar a una estructura radicular altamente especializada: el nódulo maduro fijador de N_2 (Oldroyd et al., 2011; Saeki, 2011; Oldroyd, 2013). Esta característica de las simbiosis con rizobios ha promovido su uso extensivo como inoculantes, con el propósito de incorporar N_2 atmosférico en los sistemas agrícolas, incrementando la producción vegetal y contribuyendo a la fertilidad nitrogenada de los suelos. También existen bacterias de vida libre -

Cyanobacterias, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*- que bajo ciertas condiciones son capaces de fijar cantidades significativas de N_2 –0 a 60 kg N_2/ha/año-(Orr et al., 2011). Esto resulta de particular interés en suelos con baja proporción de N disponible.

I.6.2. Solubilización de fósforo

El P es, después del N, el mayor nutriente limitante para las plantas. Interviene en la fotosíntesis, en procesos de almacenamiento y transferencia de energía, en la división celular y promueve la formación y crecimiento de las raíces. Los mayores depósitos de este mineral se encuentran en formas no asimilables, y por tanto no disponibles, para el crecimiento de la planta (Glick, 2012).

Los *Microorganismos Solubilizadores de Fosfatos* (*Phosphorous Solubilizing Microorganisms* - PSM) poseen la capacidad de convertir el P insoluble en una forma accesible para la planta. Los géneros PSM con mayor potencial para solubilizar P son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* (Khan et al., 2009). La solubilización del fósforo inorgánico ocurre por acción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como glucónico y cítrico, sintetizados por diversas bacterias del suelo (Rodríguez & Fraga, 1999; Rodriguez et al., 2004; Glick, 2012). La mineralización del fósforo orgánico ocurre también a través de la síntesis de distintas fosfatasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres fosfóricos (Rodríguez & Fraga, 1999). Es importante destacar que la solubilización de fosfato y su mineralización pueden coexistir en la misma cepa bacteriana (Rodríguez & Fraga, 1999; Glick, 2012).

I.6.3. Producción de fitohormonas

La mayoría de las bacterias rizosféricas producen fitohormonas similares a las sintetizadas por plantas, que pueden afectar significativamente el crecimiento, división o extensión de las raíces (Glick, 2014). Éste constituye uno de los aspectos de mayor importancia de las PGPR, que suscita gran interés desde un punto de vista agrícola. Las fitohormonas son mensajeros químicos cuya función es controlar gran número de eventos relativos al crecimiento vegetal, como desarrollo de raíces, caída de hojas, floración, fructificación y

germinación de semillas. También participan en la tolerancia de las plantas a distintos tipos de estrés. Las principales son auxinas, giberelinas y citoquininas.

Se han identificado cuatro giberelinas en siete especies bacterianas: *Acetobacter diazotrophicus, A. lipoferum, A. brasilense, Bacillus licheniformis, B. pumilus, Herbaspirillum seropedicea y Rhizobium phaseoli.* Otras PGPR sintetizan auxinas, que influyen en el crecimiento radicular, la elongación celular, la diferenciación de tejidos, la promoción del crecimiento vegetal y las respuestas a la luz y a la gravedad. Respecto a las auxinas, los principales géneros y especies bacterianas productores de las mismas son *Azospirilum*, *Pseudomonas spp. y Bacillus megaterium*. Las citoquininas están involucradas en varios procesos de diferenciación celular, incluyendo la formación de brotes y el crecimiento primario de la raíz. Estas fitohormonas se han detectado en algunas cepas de *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus polymyxa* (Williams & De Mallorca, 1982; Nieto & Frankenberger, 1989; Garcia de Salamone et al., 2001; Lal & Tabacchioni, 2009).

I.6.4 Producción de sideróforos

Pese a que el hierro es el cuarto elemento en abundancia en la Tierra, en suelos aeróbicos no resulta fácilmente asimilable por bacterias o plantas, ya que la forma predominante, el Fe^{+3}, es poco soluble y extremadamente baja la cantidad disponible para asimilación por organismos vivos (J. F. Ma, 2005). Microorganismos y plantas requieren de una elevada cantidad de hierro, y obtenerlo de la rizósfera es problemático porque allí compiten por este elemento plantas, bacterias y hongos (Guerinot & Yi, 1994). Para sobrevivir con un suministro limitado, las bacterias sintetizan sideróforos, moléculas con excepcional afinidad por Fe^{+3}, y receptores de membrana, capaces de unirse al complejo Fe-sideróforo, facilitando su absorción (Crowley, 2006; Hider & Kong, 2010). Los beneficios de los sideróforos bacterianos en el crecimiento vegetal han sido demostrados en varios trabajos (Siebner-Freibach et al., 2003; Jin et al., 2006; Vansuyt et al., 2007; Robin et al., 2008) La provisión de hierro para las plantas, por parte de bacterias del suelo, es aún más importante cuando las mismas se encuentran expuestas a situaciones de estrés ambiental, como contaminación por metales pesados (Burd et al., 2000; Belimov et al., 2005; Braud et al., 2010).

I.7. Mecanismos de promoción indirecta del crecimiento vegetal

I.7.1. Control biológico

La capacidad de promover el crecimiento vegetal por acción de "bacterias controladoras" ha sido motivo de gran interés, particularmente para comprender los mecanismos que utilizan y emplearlas en reemplazo de pesticidas químicos. Como vía de defensa contra patógenos, las PGPR pueden utilizar los siguientes mecanismos (Beneduzi et al., 2012).

- *Control de fitopatógenos*. Los pesticidas biológicos promueven el crecimiento vegetal de manera indirecta, reduciendo la incidencia de enfermedades. Actualmente se emplean cepas de los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, que se aplican a campo o en invernadero para reducir daños causados por patógenos de suelo, foliares o post-cosecha (Ongena & Jacques, 2007).

Los mecanismos de acción involucrados son diversos, y una cepa determinada puede actuar a través de varios mecanismos expresados de manera sucesiva, simultánea y/o sinérgica (Alabouvette et al., 2009). Dos son los principales, la interacción directa con el patógeno por antagonismo y la interacción con la planta hospedadora por inducción de resistencia sistémica (Alabouvette et al., 2009; Heydari & Pessarakli, 2010).

Las formas más comunes de antagonismo son: parasitismo, competencia por nutrientes o tejidos vegetales y antibiosis. La antibiosis consiste en la producción de metabolitos secundarios tóxicos para otros microorganismos. Es un fenómeno habitual en el biocontrol y lo realizan muchas bacterias biocontroladoras como *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Haas & Défago, 2005), *Bacillus spp.* (Stein et al., 2005) y *Streptomyces spp.* (Challis & Hopwood, 2003).

- *Síntesis de enzimas líticas.* Algunas bacterias producen enzimas como quitinasas, celulasas, glucanasas, proteasas y lipasas, capaces de lisar las paredes celulares de hongos patógenos. Se ha demostrado que las PGPR que sintetizan una o más de estas enzimas, poseen actividad de control biológico contra hongos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (Frankowski et al., 2001), *Fusarium oxysporum, Phytophthora spp., Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum*, (Pérez Rojas et al., 2015).

- *Sideróforos*. Algunas cepas bacterianas pueden ejercer control biológico a través de los sideróforos que producen. Éstos evitan que ciertos fitopatógenos asimilen la cantidad suficiente de hierro, limitando su capacidad de proliferación (Kloepper et al., 1980). Las bacterias biocontroladoras tienen capacidad de producir sideróforos con mayor afinidad por hierro que los hongos patógenos (Bakker & Schippers, 1987), evitando así su proliferación en la rizósfera de la planta hospedadora (Sullivan & O'Gara, 1992).

Una visión más integral del biocontrol se basa en los denominados "suelos supresores", donde la defensa de la planta reside en el microbioma. Las raíces vegetales estimulan, enriquecen y favorecen el desarrollo de ciertos microorganismos de suelo, como primera línea de defensa contra patógenos (Weller et al., 2002; Schlatter et al., 2017). La investigación sobre suelos supresores intenta comprender cómo los microbiomas nativos pueden reducir una enfermedad, incluso en presencia del patógeno, del hospedador susceptible y de un entorno favorable. La caracterización de este tipo de actividades requiere de un enfoque global, que permita identificar la cantidad y el tipo de microorganismos involucrados.

I.8. Análisis de comunidades microbianas

El estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales constituye uno de los principales retos a los que se enfrenta la Microbiología. La dificultad de análisis de la ecología microbiana reside en la enorme diversidad de organismos existentes y en la complejidad de cada ambiente. Las bacterias poseen una amplia diversidad genética y un potencial metabólico flexible, como resultado de su capacidad adaptativa para sobrevivir en ambientes adversos (Berdy, 2012). Dado su importante rol en distintos entornos, se han dedicado grandes esfuerzos al estudio de comunidades microbianas que habitan ambientes con diferentes características. De las especies bacterianas existentes, sólo un máximo del 1% pueden cultivarse en el laboratorio (Amann et al., 1995). El fenómeno de la "no cultivabilidad" celular a partir de muestras ambientales se observó por primera vez en 1985, al detectar discrepancias entre el número de UFC/placa y los recuentos al microscopio (Staley & Konopka, 1985).). Las células "no cultivables" pueden agruparse en dos amplias categorías no excluyentes: i- grupos bacterianos sin representantes cultivables (también llamadas "*yet-to-be-cultivated cells"* o "células a ser cultivadas") debido al no

hallazgo de medios adecuados, y ii- bacterias pertenecientes a grupos que han sido previamente cultivados y cuyas células están vivas pero incapaces de replicarse ("*non-dividing cells*" o "células que no se dividen") (Puspita et al., 2012). En ambientes con baja disponibilidad de nutrientes (ej. desiertos) la proporción de bacterias cultivables es menor que en ambientes ricos en nutrientes (materia fecal y lodo activado) (Puspita et al., 2012).

El estado "viable no cultivable" (VNC) en microorganismos no bacterianos, particularmente eucariotas, no ha recibido mucha atención. Sin embargo, se ha sugerido que las levaduras vínicas pueden alcanzar dicho estado (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). Estudios recientes indican que el dióxido de azufre, agente antimicrobiano utilizado en la conservación de alimentos, induce un estado VNC en la levadura *Brettanomyces*, que produce aromas desagradables en el vino (du Toit et al., 2005; Agnolucci et al., 2010).

En los últimos años, y a través de enfoques metagenómicos, es decir, estrategias orientadas a la caracterización genómica sin cultivo de microorganismos, se abrieron nuevos horizontes para analizar la diversidad microbiana y explorar su función, con herramientas informáticas y de *screening* experimental. La potencialidad de este enfoque, basado en la obtención del DNA total de muestras naturales, su secuenciación y la búsqueda de funciones específicas, resulta muy promisorio para estudiar comunidades microbianas crípticas/recalcitrantes, y en la búsqueda de nuevas actividades y moléculas de interés básico y/o industrial.

I.9. Significado, importancia y tipos de biodiversidad

La biodiversidad hace referencia a la variedad de la vida en nuestro planeta, incluyendo las especies animales, de plantas y los microorganismos, así como la variabilidad de los ecosistemas entre sí. Es un concepto muy amplio que no sólo se refiere a los ecosistemas y sus componentes vivos, sino a los procesos ecológicos y evolutivos que los mantienen en funcionamiento (Morris et al., 2014). Algunas definiciones de biodiversidad y diversidad biológica son las que se mencionan a continuación: "La variedad de seres vivos, sus relaciones y sus interacciones con el ambiente que habita" (Janetos, 1997), "La biodiversidad es el conjunto de todas las especies de plantas, animales y microorganismos y su variación en los ecosistemas y procesos ecológicos de los que forman parte" (McNeely et al., 1990), "La variabilidad de organismos vivos

de todas las clases, incluida la diversidad interna de las especies, entre las especies y de los ecosistemas" ("Convenio sobre la Diversidad Biológica," 1992) "La biodiversidad a nivel de especies es el número de especies diferentes que aparecen simultáneamente en un área"(Halffter et al., 2001).

La diversidad microbiana en cualquier ambiente, y en particular la procariota (bacterias y arqueas), supera ampliamente la diversidad de especies multicelulares. Según el censo oceánico realizado en 2010, existen unas 230.000 especies macroscópicas que habitan los océanos, mientras las especies bacterianas se calculan en $2x10^6$ (Curtis et al., 2002). Estos datos expresan la relevancia del estudio de diversidad microbiana en diferentes ambientes. Es importante destacar que toda exploración de la diversidad requiere de referencias temporales y espaciales, que permitan realizar comparaciones (Koleff et al., 2008). A continuación se definen las medidas de biodiversidad para el estudio de un ecosistema (Zinger et al., 2012):

- *Diversidad Alfa:* es la diversidad de especies existentes en un hábitat determinado. Se mide por la riqueza (número de especies) y la distribución de las mismas. La riqueza (R) hallada va a depender fuertemente del tipo de muestreo realizado. Para corregir el sesgo introducido por el muestreo, se utilizan estimadores de riqueza, como el Índice de Chao. Y para cuantificar la dominancia se emplea el Índice de Simpson (Magurran, 2004).
- *Diversidad Beta:* es la tasa de cambio a lo largo de un gradiente o entre diferentes hábitats. Puede establecerse considerando sólo la composición de especies, mediante los índices de similitud de Jaccard o de Sorensen, o la abundancia relativa de especies, con los índices de Bray-Curtis o Morisita-Horn (Anderson et al., 2011).
- *Diversidad Gamma:* es la intrínseca de un sitio, es decir, comprende las diversidades Alfa y Beta. Estima la variedad de especies en una zona determinada, incluyendo todas las comunidades que se encuentran en el sitio.

Cabe aclarar que las diversidades Alfa y Beta son independientes, razón por la cual un hábitat puede tener un valor de diversidad Alfa medio o elevado y un valor de diversidad Beta medio o bajo (Jost, 2007).

I.10. Propiedades estructurales de una comunidad microbiana (índices de diversidad)

El conjunto de especies que coexisten en lugar y tiempo constituyen una comunidad o consorcio (Begon et al., 2006). En un sistema microbiano, el

crecimiento celular forma poblaciones; las poblaciones metabólicamente relacionadas constituyen gremios y el conjunto de éstas interaccionan formando comunidades. Es decir, que las comunidades microbianas consisten de poblaciones de células de varias especies, que interactúan entre sí desarrollando diversas actividades funcionales al interior de la comunidad y con su hospedero (Diaz & Wacher, 2003). En el enfoque ecológico, la mayoría de las comunidades microbianas sufren perturbaciones intermitentes causadas por las variaciones del entorno o por la actividad antrópica.

Las comunidades ecológicas pueden diferir en términos de tipo y número de especies que las componen. La estructura de una comunidad se evalúa mediante los parámetros composición y abundancia, en tanto su diversidad mediante riqueza y variabilidad. Tanto la estructura como la diversidad son atributos útiles para comparar comunidades microbianas, ya que miden particularidades de las mismas que pueden variar de modo independiente. Dos comunidades con igual riqueza, pero diferente patrón de distribución, tendrán valores de diversidad diferentes, siendo mayor el de la comunidad donde las especies se distribuyan con similar abundancia, y menor donde las poblaciones se distribuyan de modo menos equilibrado (Hedrick et al., 2000).

Los parámetros más utilizados para estimar diversidad en comunidades microbianas son: la riqueza de especies (S) y la distribución de especies (equidad u homogeneidad) evaluado mediante los Índices de Shannon-Weaver y de Simpson. La riqueza de especies (S), se define como el número de diferentes organismos presentes en un ambiente (Magurran, 2004), sin considerar la importancia de los mismos (Moreno, 2001). El Índice de Shannon-Weaver (H) asume que todas las especies se encuentran representadas en las muestras; indica qué tan uniformes están representadas las mismas, considerando todas las muestreadas (Shannon & Weaver, 1949). El Índice de Simpson (1-D) mide la probabilidad que dos individuos de un hábitat, seleccionados al azar, pertenezcan a la misma especie. Mientras mayor sea su valor, mayor será la diversidad de la comunidad, ya que este valor depende tanto de la riqueza de especies, como de la regularidad o equidad con que los individuos están distribuidos entre las especies. La equidad u homogeneidad mide la abundancia de cada especie y qué tan uniformemente se encuentra distribuida (Magurran, 2004). Una comunidad rica en especies, pero con distribución irregular de individuos, tendrá un índice menor que otra comunidad con menor riqueza, pero con individuos bien distribuidos. Por lo tanto, cuando se calcula la

diversidad para dos comunidades, aquélla con mayor valor D y más cercano a la Riqueza (S), será la más diversa.

Si bien el estudio de la diversidad microbiana se vale de modelos utilizados en organismos superiores, se enfrenta experimental y conceptualmente a múltiples retos, como son (Rossello-Morá & Amann, 2001): i- el problema de la definición de especie, ii- la dificultad de recuperar e identificar los microorganismos de cada ambiente; iii- los problemas inherentes a la estimación estadística de la diversidad, en relación al tamaño de muestra necesario como representativo de la comunidad y la elección del estimador estadístico de diversidad adecuado. A los efectos prácticos, la diversidad microbiana se define frecuentemente como el número y la distribución de secuencias diferentes de un marcador filogenético específico o ribotipo, provenientes de una muestra ambiental; mientras que la estructura hace referencia a los patrones de distribución de ribotipos previamente identificados.

Cuando se realizan estudios de biodiversidad a partir del gen del *16S rRNA*, se obtienen numerosas secuencias de DNA que pueden representarse como *Unidades Taxonómicas Operacionales* (OTUs), las que pueden agruparse según el grado de similitud con respecto a una base de datos de referencia (80%, 90% y 97%). Existe correlación entre el grado de similitud utilizado y los niveles taxonómicos. Se acepta que 97% se asemeja al nivel taxonómico de especie, 90% a familia y 80% a orden. Esta correlación es una generalización y debe emplearse con cuidado, puesto que en numerosos casos no se cumple.

El número total de OTUs hallados en una muestra representa la Riqueza. Si todas las secuencias se distribuyen de modo homogéneo entre las diferentes OTUs, se dice que la muestra tiene un grado elevado de equidad u homogeneidad. Cuando una muestra posee un elevado número de OTUs (elevada R), y una distribución homogénea en cada OTU, se considera que posee un grado elevado de diversidad. Para cada OTU se toma una secuencia de DNA representativa de las ubicadas en el grupo y se compara con bases de datos, para así estimar el grupo taxonómico al que se relaciona esa OTU.

I.10.1. Métodos de estudio de diversidad microbiana

Con el avance en las técnicas de biología molecular, las comunidades microbianas se estudian aplicando herramientas que permiten analizar tanto la porción cultivable como la aún no cultivable. Como se mencionó, la mayoría de

los microorganismos (más del 99%) no han podido cultivarse en el laboratorio. Sin embargo, se han desarrollado metodologías moleculares alternativas que permiten conocer y analizar la diversidad microbiana de distintos ambientes.

Los primeros métodos se basaron en el análisis de secuencias del gen *16S rRNA* (Stahl et al., 1984) ((procariotas) y/o de la región intergénica ITS, ubicada entre los genes *18S* y *26S rRNA* (hongos) (Martin & Rygiewicz, 2005); de huellas digitales o fingerprints de estos genes obtenidas por electroforesis con gradientes de temperatura (TGGE) (Thatcher & Hodson, 1981) o desnaturalizantes (DGGE) (Muyzer, Waal, & Uitierlinden, 1993); mediante hibridación fluorescente in situ (FISH) (Giovannoni et al., 1988) y analizando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (y su variante, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales o T-RFLP) (Moyer et al., 1994; Yu et al., 2009). Si bien estos métodos posibilitan evaluar la diversidad de una comunidad y la identificación y clasificación de los microorganismos, no permiten obtener información sobre sus características y las funciones que desempeñan.

Los métodos de secuenciación masiva permitieron un notable avance en la identificación de microorganismos presentes en comunidades. Para *Bacteria* y *Arquea* el marcador utilizado es el gen *16S rRNA* (Ward & Bateson, 1990; Zou et al., 2017). Su elección se basa en su valor como cronómetro evolutivo: está presente en todos los organismos y posee regiones con secuencias conservadas (útiles para diseño de *primers*) y otras con secuencias variables. Si bien se utilizaron otros marcadores (como *dnaK33*, *amoA*, *nifH* y otros genes del metabolismo de nitrógeno), el gen *16S rRNA* sigue siendo el más indicado para analizar comunidades microbianas (Martini, 2016).

Las tecnologías de secuenciación masiva también permiten determinar variaciones en la composición de comunidades durante un período de tiempo, espacialmente, por adición de un compuesto o sustrato, o luego de alguna perturbación del sistema. Este tipo de análisis sólo posibilita identificar los microorganismos presentes, pero no saber qué genes o funciones se encuentran activos, si bien las funciones pueden inferirse a partir de la composición y diversidad de la comunidad microbiana (Pérez-Valera et al., 2015).

I.10.2 Estudios ómicos e implementación de herramientas de secuenciación masiva (High Throughput Sequencing, HTS)

Los estudios que involucran técnicas ómicas han permitido la integración y combinación de diversos tipos de información biológica (Haas et al., 2017). En estos estudios se incluyen:

- *Genómica:* estudia la estructura, función, evolución y mapeo del DNA de individuos.
- *Transcriptómica:* estudia y compara transcriptomas, o sea, el conjunto de RNA mensajeros (mRNA) o transcriptos presentes en una célula, tejido u organismo. Como los proteomas, los transcriptomas son variables, y muestran los genes que se expresan en un momento dado.
- *Proteómica:* estudia y compara, cuali- y cuantitativamente, el perfil de proteínas (proteoma) de una célula, tejido u organismo, en un momento o condición particular. No sólo analiza la expresión génica, sino también las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas, así como la interacción entre ellas.
- *Metabolómica:* estudia y compara los metabolomas, o sea, la colección de metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo, en un momento dado. Estos metabolitos incluyen a intermediarios metabólicos, hormonas y otras moléculas de señalización, así como metabolitos secundarios.
- *Metagenómica*: estudia los genomas de una comunidad microbiana y constituye el primer paso para estudiar el microbioma.
- *Metatranscriptómica*: es el análisis simultáneo de todos los mRNA presentes, proporcionando una evaluación más precisa de los procesos metabólicos que ocurren al momento de recolección de la muestra.

Durante los últimos tres siglos y medio, la Microbiología experimentó una serie de transformaciones, que fueron modificando la postura de los microbiólogos en relación a cómo ver y estudiar los microorganismos. Desde 1880 en adelante, el mundo microbiológico estuvo restringido a tubos, placas de cultivo y microscopio. A partir de 1985, la visualización del mundo microbiano comenzó a cambiar radicalmente, primero por el trabajo de Staley & Konopka (1985), informando sobre lo que llamaron *great plate count anomaly*, seguido por las investigaciones del grupo de Woese, que identificaron al gen *16S rRNA* como molécula marcadora útil para evaluar la diversidad y evolución

microbiana (Woese, 1987), y por el trabajo de Pace et al., (1986) que, mediante análisis de los genes *5S* y *16S rRNA* en diferentes ambientes, describieron la diversidad de microorganismos sin necesidad de cultivarlos.

El término metagenómica, inicialmente acuñado por Handelsmanl et al., (1998),surgió una década después y se refiere al análisis basado en las funciones del DNA de las especies en ambientes mixtos. Sin embargo, un nuevo concepto, más ampliamente aceptado, surge de dos trabajos publicados en 2004. Ambos describen la aplicación de la secuenciación aleatoria para poblaciones microbianas (Tyson et al., 2004; Venter et al., 2004) y resultaron fundamentales tanto en la definición del camino a seguir en futuras investigaciones, como en evidenciar la magnitud y el esfuerzo requeridos para secuenciar y analizar comunidades microbianas. La metagenómica permite cubrir una amplia gama de escenarios, desde los muy simples (ambientes extremos habitados por un pequeño grupo de microorganismos (Tyson et al., 2004), hasta los muy complejos (entornos habitados por una gran variedad de especies (Venter et al., 2004). Ambas investigaciones proporcionaron un conocimiento fascinante sobre las capacidades genéticas de las respectivas comunidades microbianas y las potenciales interacciones de los microorganismos entre sí y con su medio ambiente.

El desarrollo de la metagenómica y de la metatranscriptómica resultó posible gracias a las técnicas de secuenciación masiva (HTS), que permiten secuenciar en forma paralela millones de moléculas de DNA, obteniendo una enorme cantidad de datos. Las técnicas HTS han resultado de utilidad en estudios de marcadores filogenéticos específicos (*metabarcoding)*, posibilitando la exploración en profundidad del DNA total de comunidades microbianas. Emplean genes *target* de una comunidad específica (Sigut et al., 2017)(Figura I.4).

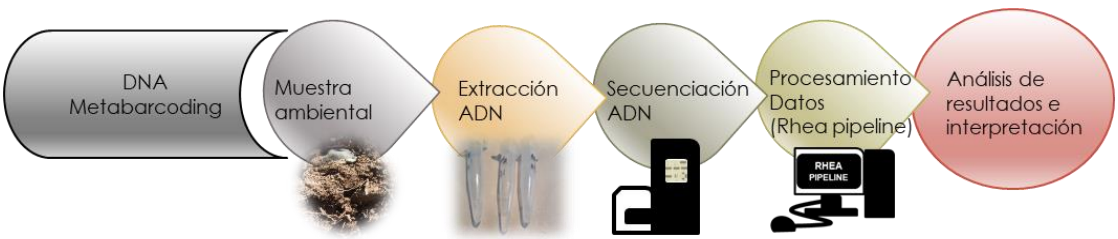

Figura I.4. Etapas del estudio de *metabarcoding* de DNA.

I.10.3. Marcadores filogenéticos más empleados

Un marcador molecular para estudios filogenéticos, taxonómicos o de evolución, debe cumplir con las siguientes características: i- contener una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie; ii- poseer sitios conservados, que permitan el diseño de *primers* universales para amplificación por PCR; y iii- obtener amplicones de longitud adecuada para permitir su extracción y secuenciación de manera simple, reproducible y precisa (Kress & Erickson, 2012).

El gen *16S rRNA* es el más utilizado en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su estructura parece mantenerse por largos períodos de tiempo y, dado que su función no se ha modificado, los cambios en la secuencia probablemente resulten aleatorios. Su contraparte eucariota es el gen *18S rRNA*. Estos genes sufren mutaciones lentamente; la tasa de mutación del gen *16S rRNA* es relativamente constante entre grupos bacterianos, a diferencia del gen *18S rRNA*, cuya tasa evolutiva hace difícil la identificación de ciertos niveles taxonómicos en eucariotas. Sin embargo, los genes *rRNA* poseen suficiente variabilidad como para diferenciar no sólo los organismos taxonómicamente alejados, sino también los próximos, posibilitando la diferenciación de especies y cepas. El gen *16S rRNA* contiene nueve regiones (V1-V9) hipervariables (Baker et al., 2003) que aportan información útil para estudios de filogenia y taxonomía. El diseño de *primers* universales, sobre regiones conservadas, permite amplificar las diversas regiones hipervariables presentes en los microorganismos de una comunidad. Mediante análisis *in silico* se determinó que el segmento que incluye las regiones V4/V5 resulta el más eficiente para analizar la microbiota intestinal, mientras que el correspondiente a las regiones V7/V8 es el menos eficiente a tal fin (Liu et al., 2007; Liu et al., 2008; Valenzuela-González et al., 2015).

En el caso de los microorganismos eucariotas, dada la tasa evolutiva del gen *18S rRNA*, es común utilizar los espaciadores transcriptos internos (*Internal Transcribed Spacer,* ITS) para la clasificación de levaduras y hongos. El ITS tiene una importante tasa de evolución que permite la identificación de especies estrechamente relacionadas (Monard et al., 2012). La región ITS incluye a su vez las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen *5.8S rRNA*, ubicado entre los genes *18S rRNA* (SSU) y *28S rRNA* (LSU) (Figura I.5). El elevado número de copias/célula del espaciador ITS (hasta 250) convierten a esta región en un

marcador interesante y de suma utilidad, incluso cuando la cantidad de DNA a analizar es baja.

Dado que la asignación taxonómica se realiza por comparación de secuencias, éstas deben almacenarse en bases de datos, las cuales constituyen herramientas de búsqueda y comparación. Existen diferentes bases de datos y programas a utilizar para la asignación taxonómica; cada programa obedece a diferentes estrategias de análisis y las bases de datos con las que operan muestran ciertas variaciones.

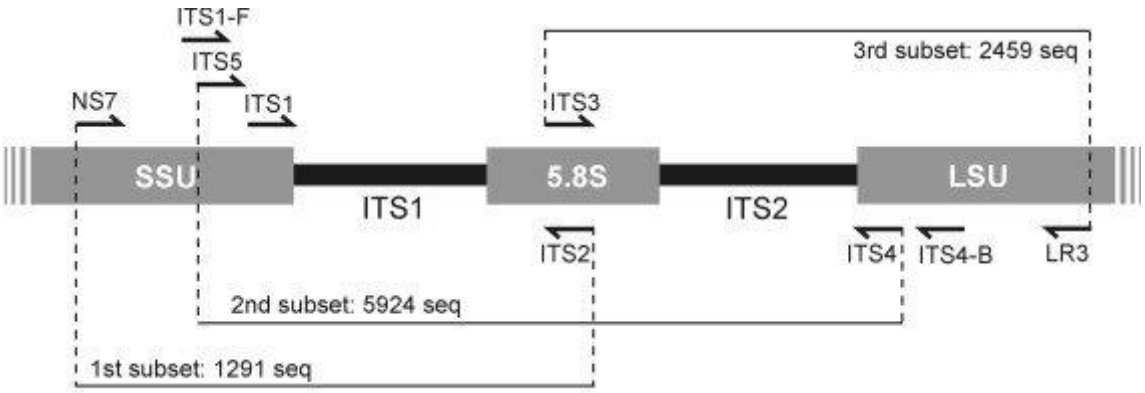

Figura I.5 Ubicación de la región ITS. Las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen *5.8S rRNA*, ubicado entre los genes *18S rRNA (SSU)* y *28S rRNA (LSU)*. Extraído de (Bellemain et al., 2010b).

Es importante señalar que la bondad de una clasificación se relaciona con la base de datos subyacente. El *Ribosomal Database Project* se mantiene en el Centro de Ecología Molecular de la Universidad de Michigan, y se actualiza periódicamente. Incluye más de tres millones de genes *16S rRNA* (bacterianos y de arqueas), así como varios miles de genes *28S rRNA* y dos conjuntos separados de secuencias ITS fúngicas. Otra base de datos actualizada es SILVA, mantenida por el Grupo de Genómica Microbiana y de Bioinformática en MPI Bremen; contiene más de cinco millones de secuencias *16S* y *18S rRNA* y más de 700,000 secuencias LSU y SSU (*18S* y *28S rRNA*).

Las tecnologías de secuenciación masiva incluyen una serie de pasos universales, que se agrupan en la preparación de bibliotecas, las reacciones de secuenciación y el análisis de los datos obtenidos. La combinación única de protocolos específicos distingue a cada tecnología y determina el tipo y cantidad de datos producidos en una plataforma determinada. Las diferencias entre plataformas pueden resultar notables cuando se comparan los datos en cuanto a calidad, cantidad y costo de la secuenciación (Metzker, 2009; Alkan, et al.,

2014). Los diferentes sistemas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés, *Next-Generation Sequencing*) tienen en común una elevada producción de datos, a partir de la secuenciación masiva en paralelo, en el orden de las "Gigabases" o "Terabases".

I.11. Plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS)

Se las clasifica como tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación (Schadt et al., 2010; Niedringhaus et al., 2011; Pareek & Smoczynski, 2011; Liu et al., 2012), pero no hay una definición coherente de esta terminología, y resulta difícil asignar, de forma inequívoca, a una u otra categoría (Schadt et al., 2010; Thompson & Milos, 2011). De modo general, se consideran de segunda generación los que dependen de una etapa de amplificación vía PCR, para intensificar la señal previo a la secuenciación, e incluyen plataformas como 454 Life Sciences (*Roche*), Illumina (*Biosystems*), SOLID (*Life Technologies*) e Ion Torrent (*Thermo Fisher Scientific*) (Knief, 2014). La considerada de tercera generación es la PacBio RS (Pacific Biosciences), con capacidad para secuenciar fragmentos de DNA miles de veces y con gran precisión y leer secuencias de 1000 a 1200 pb. Esto resuelve ciertos problemas asociados a las plataformas de segunda generación, como regiones homopoliméricas, repeticiones en tándem, lecturas cortas, y constituye un significativo avance respecto de aquéllas cuya máxima capacidad de lectura es 100 bases (Metzker, 2010; Merriman & Rothberg, 2012; Knief, 2014). El empleo de amplificación por PCR puede potencialmente introducir un sesgo (Morey et al., 2013; Goodwin et al., 2016). Otras ventajas de los sistemas de tercera generación son la reducción de costos y la velocidad de secuenciación. En la elección de una plataforma deben considerarse, entonces, varios factores: longitud de las lecturas generadas, rendimiento, precisión y número de veces que cada fragmento de DNA se secuencia de modo independiente, y costos.

I.11.1. Estudio de la microbiota asociada a vid

La industria vitivinícola ha seleccionado, a lo largo de milenios, distintos cultivares de vid con diferentes características (tamaño de uva, forma, color, sabor, rendimiento, etc.), asociado a variaciones en la composición del suelo, manejo del agua, clima y prácticas culturales. Sin embargo, la flora microbiana

comensal coexistente con la planta puede ser otro factor clave con influencia en las características del viñedo, que no se tuvo en cuenta salvo en relación a agentes patógenos causantes de enfermedades en vides: enfermedad de Pierce, causada por *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*; corona de cuello (*Crown gall*), causada por *Agrobacterium* spp.; y tizón de fuego, causada por *Xylophilus ampelinus* (Burr & Katz, 1983; Newman et al., 2003; Martins et al., 2013). Investigaciones recientes analizaron la diversidad de bacterias endófitas de vid, y demostraron que *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., pueden actuar como agentes biológicos supresores de enfermedades (West et al., 2010; Compant et al., 2011). Se propuso que los microorganismos que colonizan la raíz pueden también migrar y colonizar tejidos aéreos de la planta, ya sea interna o externamente. No obstante, la manera en que realizan estos desplazamientos no ha sido dilucidada (Compant et al., 2011).

Los estudios de biogeografía, o sea, distribución de microbiotas de vides, se han centrado en levaduras y hongos micorrícicos arbusculares. Las poblaciones de *S. cerevisiae* han mostrado exhibir fluctuaciones periódicas de presencia o ausencia, en diferentes regiones, influenciadas por factores climáticos, y de edad y tamaño del viñedo (Barata et al., 2012; Setati et al., 2012). Trabajos recientes, en diferentes regiones vitivinícolas, sugieren que la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares podría estar influenciada más por el tipo de suelo que por las características de la planta hospedadora o las prácticas agrícolas (Schreiner & Mihara, 2009; Balestrini et al., 2010; Likar et al., 2013).

Los estudios microbiológicos tradicionales se han desarrollado en etapas avanzadas de madurez de la uva, con poblaciones microbianas de 10^4 a 10^6 CFU/g. En esta etapa, los microorganismos más abundantes son las levaduras y varias especies de bacterias lácticas y acéticas (Kántor et al., 2017), si bien las levaduras fermentadoras óptimas como *S. cerevisiae* se hallan en muy baja concentración (10-100 cfu/g por baya)(Setati et al., 2012). Las bacterias cultivables más encontradas son las del ácido acético (*Acetobacter* y *Gluconacetobacter*) y las lácticas (*Lactobacillus*, *Oenococcus* y *Pediococcus*) (Belda et al., 2017). Entre las levaduras, los miembros del género *Saccharomyces* han despertado la mayor atención, por ser los principales agentes de fermentación alcohólica empleados como inóculos (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus*). También se aislaron otros géneros asociados al deterioro del vino (*Brettanomyces/Dekkera*,

Issatchenkia, *Zygoascus* y *Zygosaccharomyces*) (Belda et al., 2017). Si bien los métodos dependientes de cultivo resultaron útiles para identificar y caracterizar microorganismos asociados a la vid, mostraron una imagen sesgada de la composición real de la comunidad microbiana (Belda et al., 2017).

Para ampliar la información sobre la microbiota de superficie de uvas, Kántor et al., (2017) realizaron aislamientos que identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Lograron identificar 11 géneros de bacterias Gram-negativas, 11 de bacterias Gram-positivas y 9 de levaduras. De los 200 aislamientos obtenidos, 11% correspondió a bacterias Gram-negativas, 27% a Gram-positivas y 62% a levaduras. Los géneros de levaduras más identificados resultaron *Hanseniaspora* (37%), *Metschnikowia* (31%) y *Rhodotorula* (10%). Las bacterias Gram negativas más aisladas correspondieron a los géneros *Acinetobacter* (22%), *Pseudomonas* (22%) y *Sphingomonas* (13%), en tanto los de Gram-positivas a *Bacillus* (20%), *Lactobacillus* (19%), *Leuconostoc* y *Staphylococcus* (11%).

Para obtener mayor información sobre la microbiota de *V. vinifera*, se aplicaron diferentes procedimientos. Los endófitos bacterianos fueron descritos por West et al., (2010) y por (Bulgari et al., 2014), mientras que el análisis de bacterias epífitas de fruta, hoja y corteza la realizaron West et al., (2010) y Bulgari et al., (2014) utilizaron cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) para identificar bacterias cultivables, y DGGE para caracterizar la comunidad endófita. Muchos aislamientos se identificaron como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Curtobacterium* spp., y por primera vez se informó la presencia de actinomicetos como endófitos de vides. Los perfiles DGGE mostraron homogeneidad para la comunidad de endófitos bacterianos. Martins et al., (2013) compararon tamaño y estructura de la comunidad bacteriana en suelos de viñedos, así como en corteza, hojas y frutos de vid, y hallaron que los análisis de bacterias cultivables mostraban diferencias en las poblaciones de cada ecosistema. La mayor población y diversidad se encontró en muestras de suelo, seguidas por corteza, uvas y hojas. La identificación de aislamientos reveló que géneros como *Pseudomonas*, *Curtobacterium* y *Bacillus*, estaban presentes en todos los ecosistemas pero en cantidades diferentes, mientras que otros eran específicos del ecosistema (Martins et al., 2013).Los grupos filogenéticos presentes en suelo varían en estructura según factores ambientales y ecológicos. Entre los constantemente identificados están las *Proteobacteria* (Novello et al., 2017), *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*,

Planctomycetes (Castañeda & Barbosa, 2017), *Actinobacteria* (Zhang et al., 2017), *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* y *Gemmatimonatedes* (Morgan et al., 2017).

La caracterización de hongos de vides no ha experimentado los mismos avances que la de bacterias, ya que los estudios de interacciones fúngicas se han limitado a los aspectos patogénicos para plantas, implementando herramientas dependientes de cultivo (Pancher et al., 2012). Por otra parte, y dado el interés enológico en levaduras, la mayoría de las investigaciones se restringieron a este grupo de hongos unicelulares, sobre todo de la especie *S. cerevisiae*. Pese a esto, se identificaron 906 especies de hongos asociados a *Vitis sp.* Jayawardena et al., (2018) recopilaron estos datos, y señalaron que considerando las diferentes metodologías empleadas podría haber errores, indicando que se necesita una mayor investigación. No obstante, entre las especies identificadas, varias pertenecen a las familias *Sclerotiniaceae, Ascomycota, Cladosporiaceae, Pleosporaceae, Clavicipitaceae, Bionectriaceae, Glomerellaceae, Ploettnerulaceae, Nectriaceae, Helotiaceae, Camarosporiaceae, Graphostromataceae, Capnodiaceae, Hypocreales, Ceratobasidiaceae, Mycosphaerellaceae, Chaetomiaceae, Chaetothyriaceae, Pyronemataceae, Onygenaceae, Leotiomycetes genera incertae sedis, Schizoparmaceae*, *Coniochaetaceae, Xylariaceae, Botryosphaeriaceae, Psathyrellaceae, Discosiaceae, Corynesporascaceae, Corticiaceae, Pseudovalsaceae, Inocybaceae, Tremellaceae*.

Asimismo, las levaduras de inicio de fermentación o levaduras apiculadas, pertenecen al grupo de los ascomicetos, como *Hanseniaspora uvarum* y *Kloeckera apiculata.* Las levaduras oxidativas (principalmente de los géneros *Candida, Pichia* y *Metschnikowia*) resultan predominantes en la madurez de la uva (Kántor et al., 2017). Otros estudios indican que las levaduras más comunes en la filosfera (microambiente que rodea la hoja) pertenecen a los anamorfos del grupo basidiomicetos: filobasidiales y tremellales de los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Sporobolomices* (Kachalkin et al., 2008).

En suelo también se hallaron hongos benéficos asociados a raíces de plantas, denominados micorrizas arbusculares, con potenciales funciones simbióticas. Actúan como extensión de las raíces, incrementando el área de absorción y optimizando la captación de fósforo y otros nutrientes de baja movilidad, y mejoran la tolerancia a enfermedades (Camprubí et al., 2008). Las cepas identificadas en suelos vitícolas son *Glomus intraradices, G. macrocarpum,*

G. mosseae y *Paraglomus occultum* (Schreiner & Mihara, 2009; Likar et al., 2013). Los principales patógenos fúngicos de la vid son *Erysiphe necator* -anteriormente llamado *Uncinula necátor*- (causante del oídio) y *Plasmopara vitícola* (causante del mildiu) (Oosthuizen, 2017). Entre los hongos que impactan en las uvas, pueden mencionarse a *Botrytis cinérea* –podredumbre gris-, *Alternaría sp.* –podredumbre de racimo- (Steel et al., 2013) y *Aspergillus sp.* –productor de micotoxinas, como ocratoxina A- (Pinto et al., 2014).

I.11.2. Microbiomas y prácticas agronómicas

La caracterización de microbiomas también ha tenido por objeto comprender la influencia de las prácticas agronómicas en la estructura de las comunidades y buscar señales o firmas microbianas específicas de órganos de la vid (Morgan et al., 2017). Resulta cada vez es más necesario investigar la existencia de firmas microbianas geográficas, relacionadas con la tipicidad del vino. Bokulich et al., (2014) aplicaron NGS al gen *16S rRNA* y a la región espaciadora ITS, para determinar la abundancia relativa de bacterias y hongos en mosto de uva de ocho viñedos, correspondientes a las cuatro principales regiones productoras de vino en California, USA. Demostraron que el microbioma asociado a etapas tempranas de la fermentación vínica muestra cierta dependencia con la biogeografía y que las diferentes regiones vitivinícolas mantienen diferentes comunidades microbianas, con cierta influencia del varietal vínico y del año de producción. Vega-Avila et al., (2015), aplicando diferentes estrategias, analizaron la diversidad de microorganismos asociados a *V. vinifera* L. sometida a distintas prácticas agrícolas, en San Juan, Argentina. Los investigadores hallaron gran diversidad de microorganismos tanto en los viñedos con manejo convencional como en los que se aplicaba manejo orgánico.

Zarraonaindia et al., (2015) caracterizaron la dinámica espacial y temporal de comunidades bacterianas asociadas con distintos órganos de la vid y con suelos, para determinar la influencia del tipo de cultivar de vid, los parámetros edáficos, la etapa de desarrollo de la planta y el tipo de viñedo. Demostraron que las comunidades asociadas con hojas, flores y uvas comparten una mayor proporción de taxones con las del suelo que, entre ellas, resultado que sugiere el rol del suelo como reservorio de microorganismos.

En 2016, Bokulich et al., (2016) hallaron que las asociaciones entre la microbiota del vino y las propiedades fermentativas sugieren nuevos vínculos

entre la microbiota, el resultado de la fermentación y la calidad y propiedades del vino. Demostraron que los consorcios bacterianos y fúngicos de las fermentaciones vínicas, originados en viñedos y bodegas, se correlacionan con la composición química del vino terminado y predicen la abundancia de metabolitos en éstos.

Otro trabajo examinó los microbiomas asociados a suelo y uvas, mediante análisis del gen *16S rRNA* y del espaciador ITS, en tres situaciones de manejo de suelo, i- con aplicación de herbicida, ii- con remoción de vegetación y iii- con vegetación natural (sin remoción), en un viñedo de Nueva York, con vides del varietal Riesling, durante tres años (Chou et al., 2018). Demostraron que la composición bacteriana del suelo con vegetación natural difería de la observada en suelo desnudo (mantenido con glifosato). Respecto a los hongos, la comunidad en suelo con vegetación natural fue diferente a la de los otros dos suelos.

Jayawardena et al., (2018) compararon, en vides de varietales Red Globe y Carbanate Gernischet, en China, las comunidades de hongos saprotróficos, por técnicas dependientes e independientes de cultivo. Mediante el enfoque tradicional detectaron 45 taxones, 19 de los cuales se detectaron en ambos cultivares. Con la plataforma Illumina, y la secuencia ITS1, detectaron 226 OTUs fúngicas, de las cuales 176 y 189 pertenecían a los cultivares Carbanate Gernischet y Red Globe, respectivamente. 139 OTUs resultaron compartidas entre ambos cultivares, en tanto 37 y 50 OTUs fueron específicas de Carbanate Gernischet y Red Globe, respectivamente. En Carbanate Gernischet, *Ascomycota* representó el 77% de las OTUs y en Red Globe, casi todas las secuencias correspondieron a *Ascomycota*. La superposición de taxones de hongos, a nivel de género y especie, entre el enfoque dependiente y el independiente de cultivo resultó relativamente baja (Jayawardena et al., 2018).

Recientemente, y a través del análisis del gen *16S rRNA*, se demostró que las comunidades bacterianas de rizósfera de vides, implantadas en un mismo suelo y viñedo, están significativamente asociadas con el genotipo del pie usado para injertar, y tienen diferentes composiciones e interacciones (Marasco et al., 2018).

Los trabajos antes mencionados plantean nuevas perspectivas para desarrollar investigaciones integradas, que permitan conocer el efecto de las variables ambientales en la composición de los microbiomas y su dinámica en especies cultivadas, en función del tiempo y del espacio. También plantean que

una caracterización de la microbiota post-cosecha, podría servir de predictor de la composición química final del vino.

I.12 OBJETIVO GENERAL.

Las comunidades microbianas asociadas a la vid pueden desempeñar funciones específicas en la resistencia a enfermedades y en la productividad. Además, la microbiota de las uvas tiene el potencial de modificar las propiedades organolépticas del vino, contribuyendo a la expresión del *terroir* regional en los mismos. La comprensión de los factores que influyen en la selección de determinados tipos de microorganismos puede proporcionar información que permita seleccionar las prácticas de manejo más adecuadas para así mejorar las propiedades del vino.

Es en ese sentido que el presente proyecto propone estudiar la microbiota asociada a plantas de vid de distintas regiones vitivinícolas del país, como un primer abordaje hacia la caracterización de los *terroirs* argentinos y hacia la búsqueda de bioinsumos que contribuyan al mejoramiento de la productividad y control de enfermedades en dichos cultivos.

I.12.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1# Caracterizar las variaciones de la microbiota asociada a la vid en función de las zonas geográficas, del clima y de los varietales de vid. Caracterizar los microorganismos que colonizan la superficie de raíz, hojas y uvas por técnicas independientes de cultivo.

a. Caracterizar la comunidad de hongos de distintas regiones vitivinícolas en una misma vendimia.

b. Caracterizar la microbiota de una misma región en tres vendimias consecutivas.

2# Obtener una colección de bacterias aisladas de la vid. Caracterizar fenotípicamente los aislamientos y seleccionar cepas inocuas para la salud humana, animal y el medio ambiente que promuevan el crecimiento vegetal y/o controlen enfermedades de la vid causadas por microorganismos.

Capítulo II. *Relaciones entre comunidades fúngicas epífitas (uvas, hojas y rizósfera) de vides cultivadas en diferentes regiones vitivinícolas*

II.1. Introducción

Las plantas hospedan diversas comunidades microbianas y al microbioma asociado a las mismas se lo define como la colección de microorganismos que colonizan la rizósfera (interfase suelo – raíz), la filosfera (superficies aéreas) y la endosfera (tejidos internos) (Turner et al. 2013). Según esta definición, los microorganismos asociados a plantas se pueden agrupar de manera genérica en dos categorías: epífitos, presentes en el exterior de la misma (rizósfera o filosfera) y endófitos, que habitan en el interior de los tejidos vegetales (McInnes, 1988). En el caso de la vid, estas comunidades viven en complejas asociaciones con los tejidos vegetales y desempeñan importantes roles en la promoción de la sanidad y la productividad del cultivo (Berg et al., 2005). La flora microbiana de la vid constituye un factor clave con influencia en el rendimiento y características de las uvas, incidiendo luego en la calidad del vino obtenido (Vincent et al., 2005, Nicholas et al., 2012). Hasta hace poco, las comunidades microbianas asociadas a la vid se estudiaron en relación a patógenos (Panagopoulus, 1969) y a bacterias endófitas (Martins et al., 2013). Respecto a la contraparte epífita, los estudios se enfocaron en microorganismos de interés enológico, especialmente en bacterias acéticas y del ácido láctico y en comunidades de levaduras (Barata et al., 2012; Lonvaud-Funel, 2001). Poco se sabe aún de las relaciones entre comunidades microbianas asociadas a uvas y a otros tejidos de la planta, como hojas y raíces, así como de la incidencia de factores ambientales, geográficos y de manejo agrícola.

La mayoría de los estudios sobre riqueza, diversidad y distribución espacial de comunidades microbianas se ha centrado en bacterias (Martiny et al., 2006) prestando menor atención a los microorganismos eucariotas (Bik et al., 2012). Los hongos cumplen roles críticos en todos los ambientes terrestres y constituyen un elemento importante de la biodiversidad global, controlando procesos clave en diferentes ecosistemas. Se los conoce mejor por su función degradadora, dominando la descomposición del material vegetal, y particularmente de

la celulosa lignificada. Producen, además, una amplia gama de enzimas extracelulares capaces de degradar polímeros orgánicos complejos a formas más simples, luego utilizadas por los mismos hongos o por otros organismos.

Comprender la riqueza y diversidad de las comunidades microbianas en relación al tiempo y al espacio resulta imperativo para alcanzar un conocimiento integrado de su función en un ecosistema (Hodge et al., 2001; van der Heijden et al., 2008). Las nuevas técnicas de secuenciación del DNA total de comunidades microbianas muestran una imagen compleja de distribución de la diversidad biológica en las mismas (biogeografía microbiana), con evidencia de comunidades estructuradas y no estructuradas (Taylor et al., 2014) y sugieren, en el caso de las fúngicas, que las distribuciones pueden variar de estrechamente endémicas a globales (Taylor et al., 2006).

A lo largo de su ciclo de vida, las vides interactúan con una amplia variedad de hongos filamentosos y levaduras que colonizan los tejidos vegetativos y los órganos reproductivos (Pancher et al., 2012). Los hongos asociados a frutales pueden afectar el desarrollo de plantas y frutas, además de ser responsables de conducir la fermentación de las mismas, imponiendo calidad y estilo al producto final (Swiegers et al., 2005; Barata et al., 2012).

La identificación de especies fúngicas se basó, tradicionalmente, en la observación al microscopio, el aislamiento por cultivo y el análisis bioquímico y genético; sin embargo, estas técnicas sólo resultan útiles para hongos cultivables en el laboratorio. Los estudios independientes de cultivo permitieron incrementar el volumen de datos sobre diversidad fúngica en distintos ambientes. Recientemente Bokulich et al., (2014), mediante metagenómica aplicada al gen *16S rRNA* y el espaciador ribosomal ITS, determinaron la abundancia relativa de bacterias y hongos en mostos de uva procedentes de ocho viñedos de California, USA. Demostraron que el microbioma asociado a esta etapa de fermentación temprana de la uva muestra cierta dependencia con la biogeografía. Es decir, que distintas regiones vitivinícolas serían capaces de mantener

diferentes comunidades microbianas, con cierta influencia del cultivar vínico y del año de cosecha. Otro trabajo sugiere que el microbioma asociado a uvas puede verse influenciado por condiciones edafoclimáticas y prácticas agrícolas, y que los microorganismos persisten durante el proceso de fermentación (Mezzasalma et al., 2017). Setati et al., (2015), analizaron la estructura de comunidades fúngicas asociadas a uvas Cabernet Sauvignon provenientes de tres viñedos vecinos en Sudáfrica, a los cuales se aplicaron diferentes manejos agronómicos y hallaron que el viñedo biodinámico albergaba una comunidad más diversa que los viñedos convencionales e integrados. También encontraron que *Ascomycota* era el filo más abundante en los tres viñedos, con *Aureobasidium pullulans* y *Kabatiella microsticta* como especies fúngicas dominantes (Setati et al., 2015). Asimismo, el estadio de desarrollo de la planta puede afectar la presencia de ciertos hongos. En el caso de uvas maduras, se ha reportado una mayor presencia de levaduras oxidativas de los géneros *Cryptococcus, Rhodotorula, Sporobolomyces*, y *Filobasidium*, así como la especie del género *Ascomycota*, *Aureobasidium pullulans* o levadura negra (Barata et al., 2012; Salvetti et al., 2016).

Con el propósito de identificar los factores con mayor influencia en la estructura y diversidad de las comunidades fúngicas, se evaluaron las poblaciones de hongos presentes en uvas, hojas y rizósfera de vides de cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon provenientes de cuatro regiones vitivinícolas de Argentina, dos de Portugal y una de Francia.

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Muestras

Las muestras de uvas, hojas y rizósfera de vides Malbec y Cabernet Sauvignon de Argentina, se recolectaron de 3 parcelas ubicadas en Rio Negro, 4 en San Juan, 4 en Mendoza y 5 en Salta. También se tomaron muestras de 5 regiones vitivinícolas europeas: 2 de Cahors (Francia) y 1 de Bairrada y 2 en Alentejo (Portugal).

Las muestras de rizósfera se recogieron en la semana previa a la cosecha 2016, a una distancia mínima de 7 m de los bordes de cada parcela, a partir de 9 plantas limitadas a un cuadrante de 49 m^2. Las muestras se agruparon para obtener tres (3) réplicas por sitio (ver Figura II.S1). El suelo se tomó a 30 cm de profundidad, con pala desinfectada, y a unos 20 a 30 cm del tallo, hacia el interior de la entrefila. Las muestras de hojas y uvas se colectaron de forma aséptica, utilizando tijeras flameadas, y guantes. Todas las muestras se preservaron en bolsas estériles, etiquetadas con su respectiva nomenclatura, y se transportaron refrigeradas al laboratorio, manteniéndolas a -20 ºC hasta ser analizadas.

II.2.2. Preparación de muestras para extracción de DNA

Se realizó en una superficie limpia, con materiales esterilizados. Se implementaron procedimientos de preparación diferentes, según se tratara de muestras de hojas, uvas o rizósfera. Para obtener DNA se partió de las muestras compuestas constituidas según el esquema de la Figura II.S1.

Muestra de uvas

Las uvas de los distintos viñedos se recolectaron a mano y se trituraron, en condiciones asépticas, en el laboratorio. Sólo se utilizaron uvas sanas. Una fracción del mosto se centrifugó a 16.000 rpm y el pellet se lavó 2 veces con solución fisiológica al 0.9%. Los sedimentos se transfirieron a un microtubo de 2 ml y se almacenaron a -20 °C hasta la extracción de DNA.

Muestras de hojas

Las hojas se lavaron con solución fisiológica conteniendo Tween 80 al 0,01%, en tubos de propileno de 50 ml (2–3 hojas). Se mantuvieron en un agitador horizontal durante 1 h a 100 rpm. La solución resultante se centrifugó a 4000 g, los sedimentos se transfirieron a un microtubo de 2 ml y se almacenaron a -20 ° C hasta la extracción de DNA.

Muestras de rizósfera

Las raíces se removieron manualmente y se obtuvo el suelo adherido en condiciones de esterilidad; en algunos casos resultó necesario ayudarse con pinzas y bisturí. Para eliminar los posibles restos de raíz, las muestras se tamizaron (tamaño de poros 0.5 mm) y 0,4 g de suelo rizosférico se transfirieron a un microtubo de 2 ml y se almacenaron a -20 °C hasta la extracción de DNA.

II.2.3. Extracción de DNA

Se realizó mediante el kit FastDNA SPIN Kit *for soil* (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El DNA extraído se cuantificó mediante fluorómetro Qubit®2.0 155 (Thermo Scientific™). Para evaluar su pureza se midieron las relaciones de absorbancia espectrofotométrica 260/280 nm y 260/230 nm, respectivamente. Una relación a 260/280 > 1.8 indica un DNA de pureza aceptable en relación a la presencia de proteínas, RNA y compuestos aromáticos; una relación a 260/230 con valores de 2.0 a 2.2, indica ausencia de contaminación con sales, carbohidratos y fenoles.

II.2.4. Amplificación y secuenciación de muestras de DNA

La diversidad de la comunidad fúngica en cada muestra se analizó mediante amplificación del espaciador eucariota ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*), ubicada entre los genes ribosomales *18S rRNA* y *5.8S rRNA*), utilizando los *primers* ITS1F (5′-ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′) e ITS2 (5′-BGCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′) (Wang et al., 2017). Las reacciones de secuenciación se desarrollaron con la tecnología Illumina MiSeq.

La doble amplificación se realizó de la siguiente manera. En la primera PCR, en un volumen final de 25 µL, la mezcla contenía: 12 µL de AccuPrime™ SuperMix II (Thermo Scientific™), 0.5 µL de seroalbúmina bovina (BSA) (concentración final de 0.025 mg/mL), 0.5 µL de los *primers* completos directo y reverso (stock de 10 µM), 1.5 µL H2O estéril y 5 µL de DNA molde. Esta mezcla de reacción se sometió a una pre-incubación a 95 °C por 2 min, seguida de 33 ciclos de 95 °C por 15 seg, 55 °C por 15 seg, 68 °C por 40 seg, y de una extensión

final a 68 °C por 4 min. El DNA total se cuantificó mediante fluorómetro Qubit®2.0 155 (Thermo Scientific™).

La segunda PCR tuvo por objeto adicionar etiquetas (indizar) a cada amplicón obtenido en la primera PCR. Se empleó un volumen final de reacción de 28 µL, que contenía 12 µL de AccuPrime™ SuperMix II (Thermo Scientific™), 2 µL de *primers* con las secuencias etiquetas (index) y extremos adaptadores para Illumina P7/P5, 7 µL H2O estéril y 5 µL de amplicones de la primera PCR. Las condiciones de ciclado consistieron en: desnaturalización a 98 °C durante 1 min, seguida de 13 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 seg, hibridación a 55 °C por 20 seg y extensión a 68 °C por 40 seg, con una extensión final a 68 °C por 5 min. En ambos casos, los productos de PCR se controlaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,5%.

La purificación de los productos de esta segunda PCR (limpieza de dímeros y componentes de la reacción de PCR) se realizó con HighPrep™ PCR (MAGBIO), que adhiere selectivamente los fragmentos de DNA a secuenciar El DNA indexado se cuantificó mediante fluorómetro Qubit®2.0 155 (ThermoScientific™). A continuación, las mezclaron en cantidades equimolares de 10 ng/□l y se secuenciaron mediante IlluminaMiSeq, utilizando lecturas pareadas de 2 x 250 con V2 Chemistry (Gobbi et al., 2018).

II.2.5. Procesamiento de datos de secuenciación

El proceso de *demultiplexing* de las lecturas se realizó con el *software* bcl2fastq V.2.17.1.14 (Illumina). Los adaptadores de las secuencias se eliminaron con el *software* TrimGalore v0.4. https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore.git mediante cutadapt v1.8.3 (Martin, 2011). Las secuencias de *primers* se eliminaron desde el extremo 5' de cada lectura que forma un par; los pares de lecturas sin *primers* discernibles se descartaron utilizando Biopython.

Las lecturas se procesaron de acuerdo a la plataforma UPARSE, utilizando USEARCH V.10.0.240_i86linux64 (Edgar, 2013) con las siguientes diferencias: (i) el paso de filtrado de calidad y corte de longitud de lecturas se reemplazó por una estrategia alternativa (usearch –fastq_filter –maxee 1.0) (Edgar & Flyvbjerg, 2015), (ii) para los datos de *16S rRNA*, en el proceso de unión o *merging* de lecturas, se descartaron aquéllas fuera del rango de 373 pb a 453 pb, y (iii) el *clustering* de lecturas en Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) se realizó

con la función unoise3 de USEARCH. Las Tablas de OTUs se confeccionaron aplicando la función otutab de USEARCH.

Cuando el número de lecturas resultó inferior a 5000, se descartaron las asignaciones de OTUs. La asignación taxonómica a cada OTU se realizó mediante la función sintax (Edgar, 2016) de USEARCH, empleando como referencia la Utax Reference Dataset v7.2 (UNITE Community (2017): lanzamiento UNITE USEARCH/UTAX, Version 01.12.2017. UNITE Community. https://doi.org/10.15156/BIO/587476 se utilizó como referencia para el análisis de los datos de secuencia 16S rRNA e ITS1. Las OTUs identificadas como cloroplastos se descartaron. También se descartaron las OTUs que no contabilizaran al menos 30 lecturas o que representaran un 0,5% o más, en al menos una muestra. La construcción de árboles filogenéticos de OTUs se realizó aplicando la función cluster_agg (Edgar, 2010) de USEARCH.

Estos datos se procesaron mediante la plataforma Rhea (Lagkouvardos et al., 2017), basada en lenguaje de programación R, que permite la normalización de lecturas para calcular α- y β-diversidad, agrupación y asignación taxonómica, comparación de grupos en serie, correlación entre datos y análisis estadísticos (la significación estadística se estableció en $p \leq 0.05$; se muestran los valores de p menores a 0.05). Adicionalmente, se realizó el análisis con los programas QIIME 2 v. 2017.9 (Caporaso et al., 2010) y PAST v.3 (Hammer et al., 2001).

Alfa-diversidad (α-diversidad) se refiere a la diversidad intra-muestra; Riqueza da cuenta del número de OTUs en una muestra; Diversidad estima el número de especies iguales en una muestra; índice de Simpson se relaciona con Dominancia; índice de Shannon se relaciona con Riqueza y Equidad. Para evitar estimaciones incorrectas de la Riqueza de especies, debidas a la profundidad de la secuenciación, Rhea sólo considera los recuentos normalizados superiores a 0,5. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA (Hammer et al, 2001) para evaluar la significancia de la Riqueza y Diversidad, y se utilizó el *Tukey Pairwise* (Olleveant, 1999) para la comparación de las muestras de a pares.

Para evaluar la β-diversidad (diversidad entre muestras) se calcularon las distancias de disimilitud ecológicas entre muestras. Se consideró el grado de semejanza de la diversidad entre sitios geográficos según la región, cultivar vínico, presencia/ausencia de porta-injerto y sistema de conducción. Este último factor, como parte de las prácticas culturales del viñedo, en conjunto con la canopia, permite alcanzar un mejor rendimiento, e influyen en el microclima y otros aspectos no discutidos en este estudio.

La semejanza ecológica entre la diversidad fúngica de las muestras se examinó aplicando análisis de distancia UniFrac entre muestras, en base a un umbral de 97% de similitud entre OTUs. A partir del cálculo de distancias UniFrac generalizado (ponderación entre pesado y no pesado), se realizaron análisis NMDS y prueba PERMANOVA, para determinar diferencias estadísticamente significativas a partir de variables abióticas y bióticas.

II.3. Resultados

II.3.1. Características de las regiones muestreadas

A continuación, se describen las características de cada región en la que se colectaron muestras:

Provincia de San Juan (región vitivinícola Cuyo): posee relieve montañoso y clima árido. Las temperaturas promedio oscilan entre los 27 °C en verano y los 8 °C en invierno, con precipitaciones mensuales inferiores a 20 mm. Las muestras se tomaron de vides en pie franco del valle de Ullum (Centro Sur de la provincia de San Juan), en dos fincas, Finca Norte-FN y Finca Arriba-FA. En FN, las coordenadas de la parcela Malbec fueron 31º 27.114' S, 068º 42.523' W y las de Cabernet Sauvignon, 31º 27.002' S, 068º 42.109' W. En FA, de 31º 28.407' S, 068º 45.486'W para Malbec y de 31º 28.407' S, 068º 45.347´ W para Cabernet Sauvignon. El sistema de conducción implementado en estos viñedos es de pérgola o parral, con la excepción del cultivar Malbec (FN), en el que se utilizó espaldera debido a la posición del terreno. Ambas fincas se ubican a 780 msnm y presentan suelos desérticos de tipo franco

Provincia de Mendoza (región vitivinícola Cuyo) (principal provincia vitivinícola de Argentina): con clima similar al de San Juan. Las muestras provinieron de viñedos plantados en espaldera, ubicándose la parcela de Malbec (33° 09.437' S, 068° 53.702´ W) y Cabernet Sauvignon (33° 09.416'S 068° 53.657 W), en Agrelo (Luján de Cuyo), a 940 msnm, ambas con suelos de tipo franco-arcilloso.

Provincia de Rio Negro (región vitivinícola Patagonia): posee clima semi-árido (Easdale et al., 2009). Se tomaron muestras en la región del Alto Valle del Rio Negro y en Viedma, próxima al océano Atlántico. El Alto Valle se ubica a 402 msnm, tiene precipitaciones anuales de 120 a 180 mm y temperaturas que oscilan entre 30 a 34 ºC en verano y 10 a 14 ºC en invierno. En 2016, las

máximas y mínimas alcanzaron los 41 ºC y los 4 ºC, respectivamente. La zona está sometida a vientos fuertes, de hasta 120 km/h. Las muestras se recolectaron de una parcela Malbec, en Mainqué (39° 02.190' S 067° 19.757' W*)*, a 219 msnm, de sólo 1,5 ha, con vides plantadas en 1932 (período pre-filoxera) sobre pie franco de selección Massale, donde cada vid es genéticamente distinta. En el verano de 2016 (previo a la recolección de muestras) las vides se curaron con azufre para prevenir el desarrollo de hongos, dadas las lluvias continuas durante enero. Los suelos poseen vegetación entre hileras, y cortina de álamos como barrera contra los vientos.

Viedma, la otra región muestreada en la provincia de Río Negro, posee clima templado semiárido, dada su proximidad oceánica, con temperatura media anual de 14 °C en invierno y de 22 ºC en verano. Las temperaturas máximas estivales pueden alcanzar los 30 °C; las mínimas invernales llegan a los 2 °C y las máximas a 12 °C. Las precipitaciones anuales son de 400 mm. El verano es la estación más húmeda y más ventosa, con vientos de velocidad promedio de 28,4 km/h. Las muestras se tomaron en dos parcelas, una de Malbec (40° 46.437' S, 063° 21.831´ W) y otra de Cabernet Sauvignon (40° 46.415' S 063° 21.789´ W), ambas con suelos franco arcillo-arenoso y a 7 msnm. Las vides tienen entre 8 y 10 años.

Provincia de Salta (región vitivinícola Norte): posee clima cálido y seco, con buena presencia de sol. En los Valles Calchaquíes (SO de la provincia de Salta), la época de lluvia es cálida y parcialmente nublada y la seca mayormente despejada. La temperatura anual varía entre 5 y 25 °C; pocas veces resulta inferior a 1 °C o superior a 29 °C. Las muestras se tomaron en las localidades de Molinos (gran amplitud térmica, con máximas diurnas de 18 °C y mínimas nocturnas de -2 °C) y de Cafayate (Finca Arenal, Cachi) (clima seco, templado en verano y frío en invierno, con gran amplitud térmica diaria). Las vides muestreadas tenían entre 7 y 12 años y estaban injertadas en pies de las variedades 101-14 y SO4, que otorgan resistencia contra nematodos y filoxera. Las enfermedades de mayor incidencia en la región son el oídio y el mildiú, y se realizan tratamientos preventivos con azufre y cobre. En Cafayate se muestrearon dos viñedos, uno de Malbec (25° 30.696' S, 066° 23.352' W) y otro de Cabernet Sauvignon (25° 30.495' S, 066° 23.360' W), ambos ubicados a 1.700 msnm. En Molinos, se tomaron muestras de un viñedo Malbec (26° 04.846' S, 066° 00.022' W) y de uno Cabernet Sauvignon (26° 04.815' S, 066°

00.206' W), a 2.200 msnm. El quinto sitio fue un viñedo Malbec (25° 02.669'S, 066° 04.460' W), en Finca Arenal (Cachi), a 2.600 msnm.

En Portugal se evaluaron tres sitios, ubicados en dos regiones con Denominación de Origen Controlado (DOC): i- Bairrada, con clima templado, noches cálidas, temperatura anual promedio entre 14,9 y 18,8 °C, precipitaciones de 85 mm anuales, y suelo franco arenoso; y ii- Alentejo, con clima cálido de tipo mediterráneo e influencia continental (Gomes, 2002), temperaturas promedio entre 15,9 y 20,9 °C, precipitaciones anuales promedio de 54,4 mm, y suelo franco arcilloso (Fraga et al., 2014). Las muestras se tomaron sólo de viñedos Cabernet Sauvignon, en las cercanías de Sangalhos (40° 29' 41.7" N, -8° 27'11.3" E), a 20 msnm, en Campo Maior (Alentejo) (39° 03' 47" N, 7° 05' 45" E), a 307 msnm, y en Reguengos de Monsaraz (Alentejo) (38° 22' 42" N, 7° 33' 40" E), a 213 msnm.

En Francia las muestras se tomaron en Cahors (región Mediodía – Pirineos), con clima mediterráneo. En 2016 las temperaturas promedio fluctuaron entre 11,5 y 18,1 °C, con precipitaciones anuales promedio de 946 mm, y el viñedo muestreado (44°26'54" N, 1°08'05" E) se ubicó a 240 msnm.

II. 3. 2. Análisis de datos de secuencias del espaciador ribosomal ITS1

Para caracterizar las comunidades fúngicas de uvas, hojas y rizósfera de vides Malbec y Cabernet Sauvignon se realizó la secuenciación masiva de la región espaciadora ribosomal ITS1. Se procesaron 171 muestras provenientes de 19 viñedos (57 de uvas, 57 de hojas y 57 de rizósfera), once de cultivar Malbec y ocho de cultivar Cabernet Sauvignon (Tabla II.1).

De las muestras de uvas se logró amplificar 46, obteniendo 3.410.926 amplicones que superaron los controles de calidad, con 22.979 a 143.044 lecturas/muestra. Para hojas se amplificaron 57 de las 41 muestras, generando 2.391.164 amplicones que superaron los filtros de calidad; con 8.334 a 232.588 lecturas/muestra. Para rizósfera se amplificaron 50 de las 57 muestras, obteniendo 3.467.815 amplicones que superaron los filtros de calidad, con 6.514 a 212.851 lecturas/muestra (Tabla II.S1).

La diversidad de las comunidades fúngicas se evaluó, en cada muestra, por análisis de las curvas de rarefacción (Figura II.1). Las curvas son indicativas del esfuerzo de muestreo (lecturas por muestra); si la curva llega a ser asintótica

se considera un buen muestreo (Rodríguez & Konstantinidis, 2014), y funciona como medida de la profundidad de los ensayos.

Tabla II.1 Origen y denominación de las muestras colectadas. *Indica la ausencia de esas secuencias en el análisis de los datos.

Región	Sitio	Uvas		Hojas		Rizósfera	
		Muestras		Muestras		Muestras	
		Obtenidas	Secuenciadas	Obtenidas	Secuenciadas	Obtenidas	Secuenciadas
San Juan	**FNMA16**	3	3	3	3	3	3
	FNCA16	3	3	3	3	3	3
	FAMA16	3	3	3	2	3	3
	FACA16	3	3	3	3	3	3
Mendoza	**BTMA16**	3	3	3	1	3	3
	BTCA16	3	3	3	*	3	3
Rio Negro	**FPMA16**	3	1	3	3	3	3
	FPCA16	3	*	3	3	3	3
	BNMA16	3	3	3	3	3	3
Salta	**FAMMA16**	3	3	3	3	3	3
	FAMCA16	3	3	3	3	3	3
	FCMA16	3	1	3	1	3	2
	FCCA16	3	3	3	2	3	2
	FARMA16	3	3	3	1	3	3
Cahors	**FVM16**	3	*	3	2	3	3
	FVL16	3	1	3	1	3	1
Alentejo	**PAM16**	3	2	3	2	3	2
	PHE16	3	3	3	2	3	1
Bairrada	**PSJ16**	3	2	3	3	3	2
	Total	57	46	57	41	57	50

Las curvas de rarefacción indicaron una buena cobertura de muestreo en la mayoría de los casos. La Figura II.1.A exhibe buena cobertura para las muestras de uvas. Para algunas muestras de hojas (FARMA16, FNMA16, BNMA16 y FAMMA16) y las dos réplicas de la muestra FCMA16 de rizósfera, las curvas no alcanzaron la saturación. Sin embargo, dado que en la mayoría de los casos se observa que las curvas alcanzan un *plateau*, puede considerarse que la secuenciación masiva de la región ITS1 exhibe adecuadamente la diversidad fúngica en las comunidades analizadas.

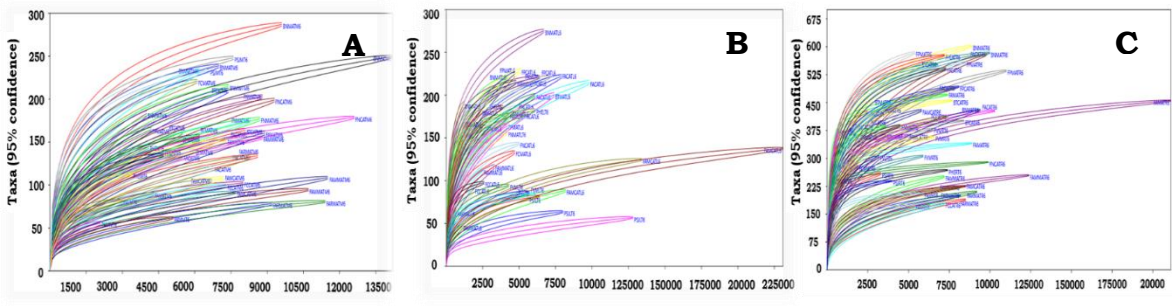

Figura II.1Análisis de rarefacción para estimaciones de taxa en comunidades fúngicas (95% de confianza). A: asociadas a uva; B: asociadas a hoja; C: asociadas a rizósfera.

El paso siguiente consistió en normalizar la profundidad de secuenciación (número de lecturas), y los valores elegidos resultaron de 8.334 lecturas para hojas, de 6.514 para rizósfera y de 22.979 para uvas.

II.3.3. Análisis de diversidad en comunidades fúngicas

Para analizar la diversidad de las comunidades fúngicas se evaluaron la Riqueza (R) (número de OTUs - *Operational Taxonomic Units*), el índice de Simpson (1-D) y el de Shannon (H). El índice de Shannon es el más empleado en estudios ecológicos (Hill et al., 2011; Martensson, 2016), pese a que su sensibilidad a especies de baja frecuencia tiende a disminuir el impacto de éstas en las comunidades. Por el contrario, el índice de Simpson (Peet, 1974; Martensson, 2016) sí considera las especies de baja frecuencia. El análisis de α-diversidad se realizó comparando R y ambos índices.

Eliminadas las secuencias correspondientes a posibles quimeras, la asignación de OTUs se realizó tomando un valor de 97% de identidad de nucleótidos, obteniendo 1.048 OTUs en uvas, 923 en hojas y 3.313 en rizósfera. Los valores de Riqueza/muestra fluctuaron entre 51 y 204 OTUs en uvas, 33 y 175 en hojas y 76 y 357 en rizósfera (Tabla II.2).

El índice de Shannon varió entre 1,55 y 2,91 para uvas, 0,67 y 3,04 para hojas y 2,08 y 4,35 para rizósfera (Tabla II.3). Este índice considera la cantidad de especies existentes en la muestra y la cantidad relativa de individuos por especie, es decir, contempla la riqueza y la abundancia de especies. El valor mínimo es cero, indicativo de ausencia de diversidad, y superior a 3 se considera comunidad muy diversa.

Tabla II.2 Valores de Riqueza en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera.

Región	Muestra	Uvas	Hojas	Rizósfera
SAN JUAN	**FNMA16**	133,33±11,90	111,67±3,30	298,67±25,98
	FNCA16	98,67±11,44	93,67±10,14	299,00±44,55
	FAMA16	100,67±7,76	157,50±8,50	284,00±88,59
	FACA16	93,33±11,59	108,33±10,40	231,00±35,56
MENDOZA	**BTMA16**	111,00±3,74	84,00	257,33±18,80
	BTCA16	116,33±15,58	*	351,00±32,62
RIO NEGRO	**FPMA16**	166,00	119,00±13,37	299,33±78,67
	FPCA16	*	137,00±5,44	343,66±39,33
	BNMA16	179,67±25,00	175,33±13,37	273,67±91,51
SALTA	**FAMMA16**	75,67±32,77	62,33±9,98	105,67±10,40
	FAMCA16	69,33±3,86	38,67±2,87	226,33±74,64
	FCMA16	175,00	87,00	305,00±84,00
	FCCA16	83,33±18,91	77,50±10,50	206,33±114,78
	FARMA16	59,00±25,57	67,00	76,00±10,03
CAHORS	**FVM16**	*	65±7,07	226,00±23,60
	FVL16	83,00	55,00	232,00
ALENTEJO	**PAMM16**	51,00±6,00	159,50±15,50	147,00±26,00
	PHEM16	123,67±15,80	139,50±4,50	188,00
BAIRRADA	**PSJM16**	204,00±3,00	33,67±10,78	204,00±2,00

*Indica ausencia de muestras.

Los valores del índice de Simpson (1-D) oscilaron entre 0,54 y 0,91 en uvas, 0,22 y 0,91 en hojas y 0,7 y 0,97 en rizósfera (Tabla II.4). Este índice mide la posibilidad de dominancia de una especie y de una población; cuando su valor se acerca a 1, mayor es el equilibrio en la diversidad de un hábitat.

La comparación de los valores de Riqueza y de los índices de diversidad obtenidos, según tejido de la vid (uvas, hojas, rizósfera), mostraron diferencias significativas mediante el análisis estadístico ANOVA (S p=1,83E-20, F=65,03; H p=9,082E-12, F=45,35; 1-D p=0,001608, F=6,752).

Tabla II.3 Valores de índice de Shannon en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera.

Región	Muestra	Uvas	Hojas	Rizósfera
SAN JUAN	**FNMA16**	2,09±0,19	2,66±0,15	4,35±0,39
	FNCA16	1,96±0,21	2,33±0,18	3,96±0,60
	FAMA16	2,17± 0,13	2,63±0,23	3,78±1,13
	FACA16	1,80±0,19	2,53±0,05	2,53±0,75
MENDOZA	**BTMA16**	2,17±0,02	2,11	3,19±0,32
	BTCA16	2,12±0,26	*	3,99±0,08
RIO NEGRO	**FPMA16**	1,81	2,55±0,62	3,46±1,05
	FPCA16	*	1,80±0,07	3,68±0,28
	BNMA16	2,91±0,16	3,04±0,09	2,92±0,91
SALTA	**FAMMA16**	1,77±0,48	1,50±0,37	2,41±0,83
	FAMCA16	1,80±0,30	1,44±0,28	3,53±0,66
	FCMA16	2,42	2,03	3,01±1,91
	FCCA16	2,06±0,20	2,26±0,43	2,39±1,31
	FARMA16	1,84±0,28	1,43	2,08±0,37
CAHORS	**FVM16**	*	1,76±0,01	3,34±0,20
	FVL16	1,53	0,67	3,44
ALENTEJO	**PAM16**	1,55±0,09	2,80±0,04	2,36±1,13
	PHE16	1,77±0,14	2,26±0,10	2,97
BAIRRADA	**PSJ16**	2,30±0,14	0,87±0,39	3,64±0,60

*Indica ausencia de muestras.

Asimismo, el análisis *Tukey Pairwise* evidenció una diferencia significativa en la diversidad de comunidades fúngicas asociadas a rizósfera y a uvas y hojas (Figura II.2). No se observaron diferencias entre las comunidades asociadas a hojas y uvas (Figura II.2). Previamente se ha descripto que las partes aéreas de la planta constituyen un ambiente hostil para los microorganismos, y por esta razón las comunidades asociadas a las mismas presentan menor diversidad (Yang et al., 2001). Las comunidades de rizósfera, al asociarse a un tejido vegetal más protegido, presentan mayor diversidad. Estas observaciones se evidenciaron también en el análisis de los índices por sitio de muestreo, con excepción de las muestras correspondientes al sitio PAMM de Alentejo, Portugal.

Tabla II.4 Valores de índice de Simpson en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera.

Región	Muestra	Uvas	Hojas	Rizósfera
San Juan	**FNMA16**	0,79±0,03	0,88±0,02	0,97±0,02
	FNCA16	0,80±0,03	0,83±0,03	0,91±0,09
	FAMA16	0,74±0,02	0,85±0,05	0,90±0,11
	FACA16	0,75±0,06	0,86±0,02	0,72±0,21
Mendoza	**BTMA16**	0,82±0,01	0,81	0,87±0,04
	BTCA16	0,79±0,07	*	0,94±0,00
Río Negro	**FPMA16**	0,70	0,65±0,20	0,86±0,17
	FPCA16	*	0,85±0,03	0,92±0,04
	BNMA16	0,91±0,02	0,91±0,00	0,79±0,15
Salta	**FAMMA16**	0,72±0,15	0,61±0,14	0,76±0,25
	FAMCA16	0,71±0,06	0,61±0,12	0,91±0,06
	FCMA16	0,82	0,77	0,70±0,37
	FCCA16	0,80±0,04	0,80±0,11	0,68±0,25
	FARMA16	0,75±0,10	0,55	0,73±0,14
Cahors	**FVML16**	0,54	0,65±0,00	0,90±0,02
	FVLM16	*	0,79	0,92
Alentejo	**PAMM16**	0,69±0,02	0,87±0,00	0,73±0,27
	PHEM16	0,72±0,02	0,78±0,02	0,88
Bairrada	**PSJM16**	0,20±0,01	0,61±0,23	0,92±0,01

*Indica ausencia de muestras

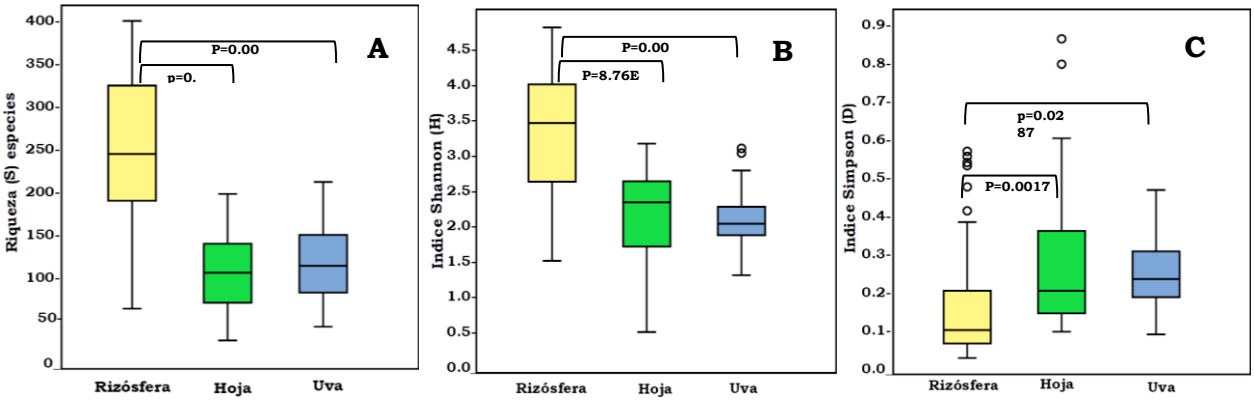

Figura II.2 Boxplot de valores de Riqueza (S), índices de Shannon (H') y de Simpson (1-D). Los análisis se realizaron de modo independiente. A, B y C: Riqueza, índice de Shannon e índice de Simpson de comunidades fúngicas. Se indican las diferencias significativas entre muestras de uvas, hojas y rizósfera, según análisis de*Tukey Pairwise*.

A fin de comparar la diversidad fúngica entre regiones (β-diversidad), se calcularon las distancias en los perfiles taxonómicos de cada sitio, obteniendo una matriz de distancias entre todas las muestras. La similitud/disimilitud entre poblaciones puede calcularse aplicando distintas métricas, como Bray-Curtis y UniFrac ponderadas y no ponderadas (Bray & Curtis, 1957; Lozupone et al., 2007). Bray-Curtis sólo considera la composición taxonómica compartida entre muestras, mientras que UniFrac contempla la distancia genética entre OTUs en cada muestra, respecto de OTUs de las otras muestras. La matriz de distancia UniFrac generalizado (Chen et al., 2012) permitió estudiar la distribución en las comunidades fúngicas aplicando gráficas de Escalamiento Multidimensional no-métrico (NMDS). Se evaluó si el cultivar de vid, el pie, el sistema de conducción y la región de origen constituían factores con influencia en la estructura de la comunidad fúngica asociada a diferentes tejidos de la vid (Figura II.3)

El análisis, mediante PERMANOVA con matriz de distancia vegan::adonis ($p \leq 0{,}001$) (Anderson, 2001) reveló la influencia del pie, del sistema de conducción y de la región geográfica en la diversidad de comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera. Respecto al cultivar, se observó que influye en la estructura de las comunidades fúngicas de uvas y hojas (valor $p \leq 0{,}003$ y $p \leq 0{,}002$), pero no en la de rizósfera (valor $p=0{,}233$).

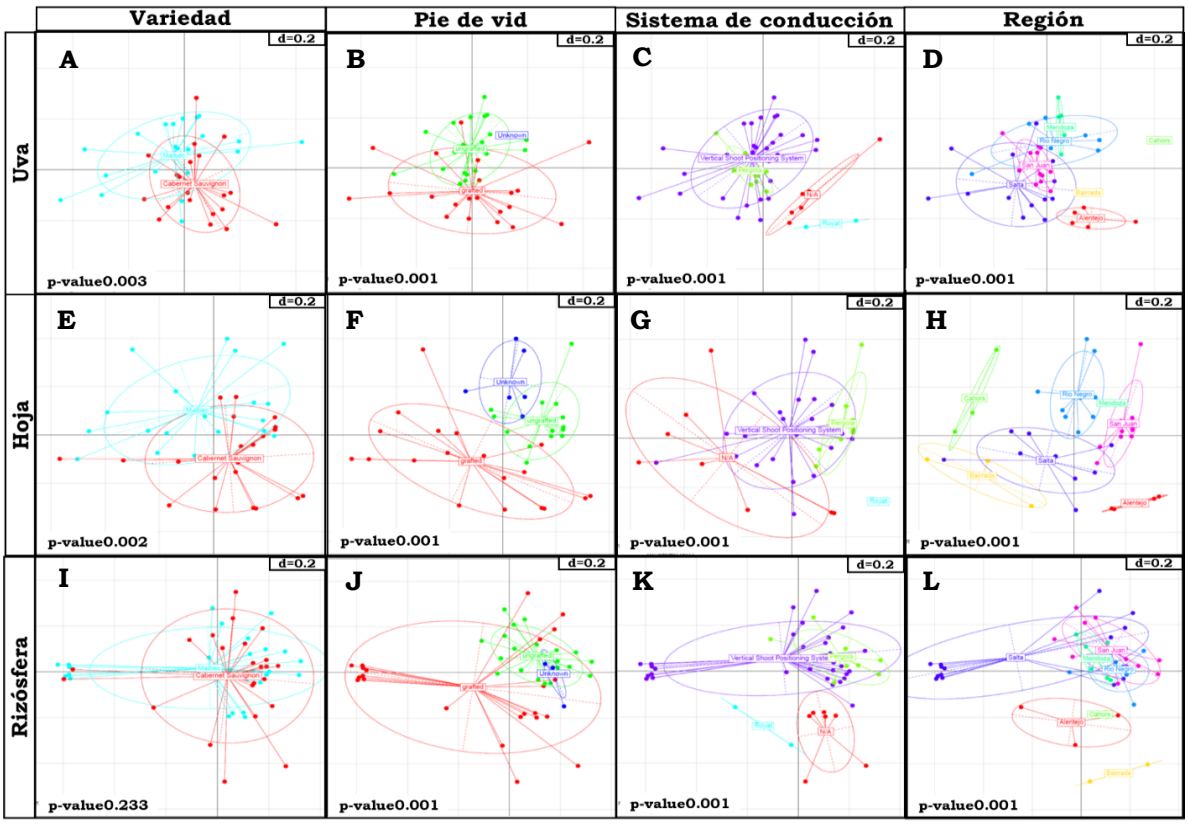

Figura II.3. Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS) de comunidades fúngicas en 14 sitios de Argentina, 3 de Portugal y 2 de Francia. Agrupación de comunidades fúngicas asociadas a uvas según: A: varietal, B: pie, C: sistema de conducción, D: región; comunidades asociadas a hojas: E: varietal, F: pie, G: sistema de conducción, H: región; comunidades asociadas a rizósfera: I: varietal, J: pie, K: sistema de conducción, L: región. Se aplicó UniFrac generalizado con distancias de disimilitud de 20%. Se incluyeron los valores P del análisis multivariado PERMANOVA.

II.3.4. Análisis taxonómico de comunidades fúngicas

La composición taxonómica de las comunidades fúngicas estudiadas mostró un total de 12 filos (Phylum) en uvas, 11 en hojas y 16 en rizósfera. Al menos 10 de estos filos se hallaron en los distintos tejidos muestreados de la vid. La mayoría de las lecturas, sin embargo, correspondieron a hongos sin filo identificado, representando un 74% en uvas, un 56,5% en hojas y un 38,4% en rizósfera. De los filos identificados, el primero en importancia resultó *Ascomycota*, con presencia del 21,8% en uvas, 30,4% en hojas y 35,6% en rizósfera. O sea que en rizósfera se observó una distribución equilibrada entre los mismos El filo *Basidiomycota* se halló en los tres tejidos de la vid, como tercero en abundancia si se considera el porcentaje de los filos sin asignación

taxonómica (Figura II.4). En uvas, las OTUs fúngicas con asignación taxonómica constituyeron el 25,78%, en hojas el 39,9% y en rizósfera el 46,85%. En rizósfera, en cambio, se halló mayor proporción de los filos *Mortierellomycota* (5,3%), *Rozellomycota* (2,4%), *Glomeromycota* (1,6%), *Mucoromycota* (0,4%), *Blastocladiomycota* (0,3%) y *Olpidiomycota* (0,06%). Estos filos mostraron abundancias menores a 0.002% en uvas y hojas, con excepción de *Rozellomycota*, que en uvas alcanzó a 0,03%. En rizósfera se identificaron otros dos filos fúngicos, *Entomophthoromycota* y *Zoopagomycota*, con abundancias inferiores a 0,05%.

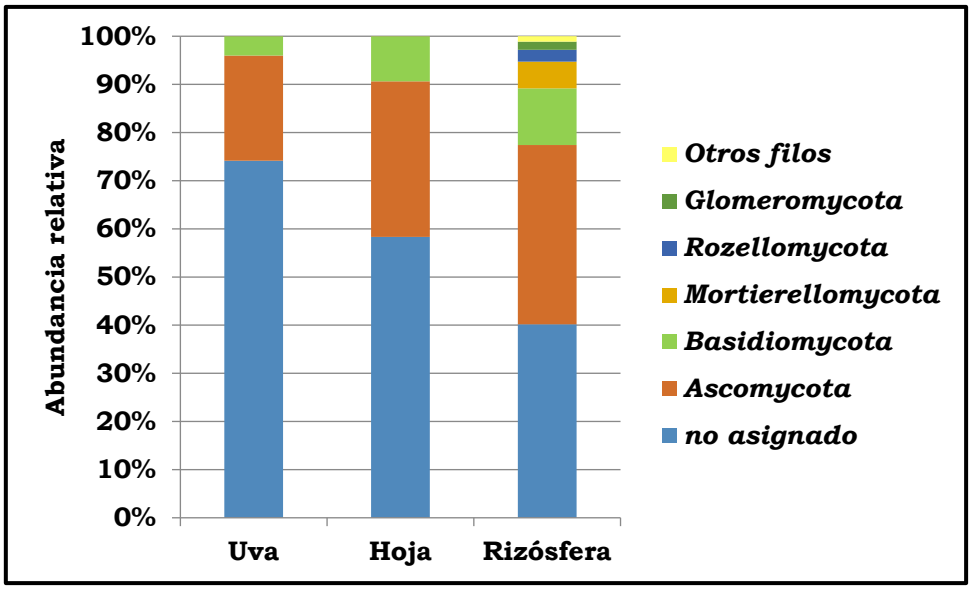

Figura II.4. Distribución de filos en comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera.

En una categoría filogenética inferior, la de Clase, la más abundante resultó ser *Dothideomycetes*, con abundancias relativas de 15,9% en uva, 32,2% en hoja y 18,2% en rizósfera. La Figura II.5 muestra las abundancias relativas de las Clases identificadas en cada sitio de muestreo. Se observó que *Dothideomycetes* es particularmente elevada en muestras de uvas de los sitios FVL16 (67,8%) (Cahors), FPMA16 (54,1%) y BNMA16 (31,4%) (Rio Negro) (Figura II.5A); en hojas de los sitios FVLA16 (89%), PSJ16 (72,3%) (Bairrada), FAMMA16 (69,3%) y FARMA16 (68,3%) (Salta) (Figura II.5B); y en rizósfera de los sitios FACA16 (53,3%) (San Juan), BTMA16 (39,3%) (Mendoza) y FCCA16 (39,2%) (Salta) (Figura II.5C). Además, *Dothideomycetes* mostró mayor abundancia en muestras del cultivar Malbec, principalmente en hojas y uvas (Figura II.6), dado

que 7 de los sitios con elevada proporción de esta Clase corresponden a ese varietal.

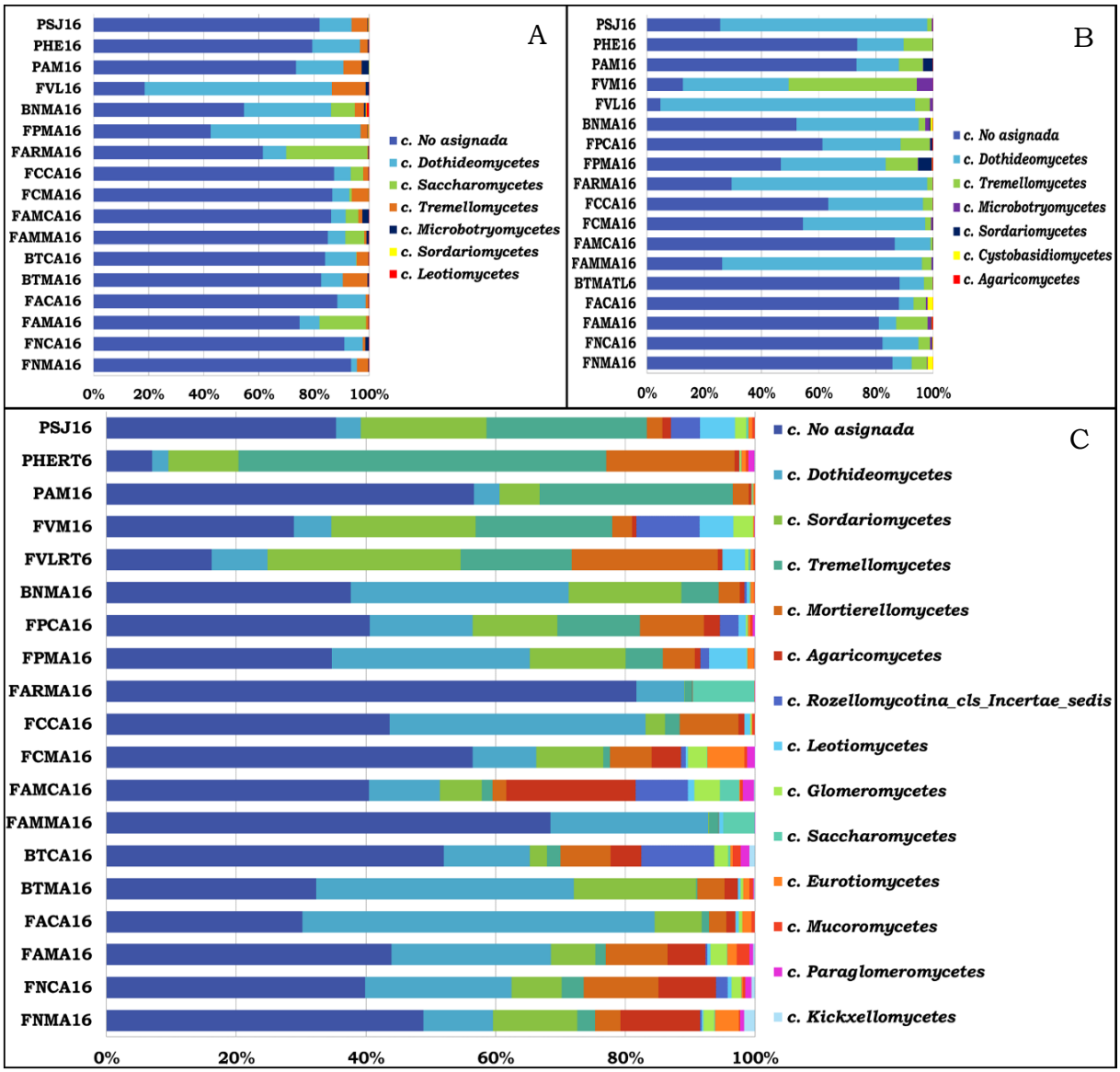

Figura II.5 Distribución de comunidades fúngicas en la categoría de Clase, por sitio de muestreo. A: uvas B: hojas y C: rizósfera.

En la categoría filogenética de Orden, *Pleosporales* resultó más abundante en rizósfera (17,7%), y *Dothideales* en uvas (9,9%) y hojas (26,1%). Los órdenes con presencia en uvas, hojas y rizósfera correspondieron a *Filobasidiales* (0,50% en uvas, 3,04% en hojas y 5,96% en rizosfera) (Clase *Tremellomycetes*); Tremellales (1,26% en uvas, 1,49% en hojas, 1,03% en rizósfera) (Clase *Basidiomycetes*); *Sporidiobolales* (0,41% en uvas, 0,58% en hojas, 0,04% en rizósfera) (Clase *Microbotryomycetes*) y *Saccharomycetales*

(levaduras) (4,64% en uvas, 0,08% en hojas y 1,11% en rizósfera) (Clase *Saccharomycetes*). Esta Clase resultó la más elevada en uvas de FARMA16 (29,5%) (Salta), seguida de FAMA16 (16,8%) (San Juan) (Figura II.5A).

El orden *Saccharomycetales* es el de mayor relevancia para la industria vitivinícola, dada la capacidad fermentadora de las levaduras. Los géneros identificados, pertenecientes a este Orden, resultaron *Aureobasidium* como predominante en uvas (7,5%) y hojas (14,8%), con baja presencia en rizósfera (1,8%). También se hallaron los géneros *Metschnikowia*, en hojas (0,04%) y rizósfera (0,8%), *Pichia*, en uvas (0.9%) y rizósfera (0,07%), *Hanseniaspora*, sólo en uvas (0,08%), *Cystobasidium* en uvas y hojas (<0.01%), *Vishniacozyma*, en uvas (1,14%), hojas (1,45%) y rizósfera (0,08%), *Sporobolomyces*, en uvas (0,3%) y hojas (0,6%), *Solicoccozyma*, en uvas (0,01%) y rizósfera (5,6%), *Rhodosporidiobolus*, en uvas (0,2%) y hojas (0,02%), y *Saccharomyces*, género principal para conducir la fermentación alcohólica, sólo hallado en rizósfera (0,004%).

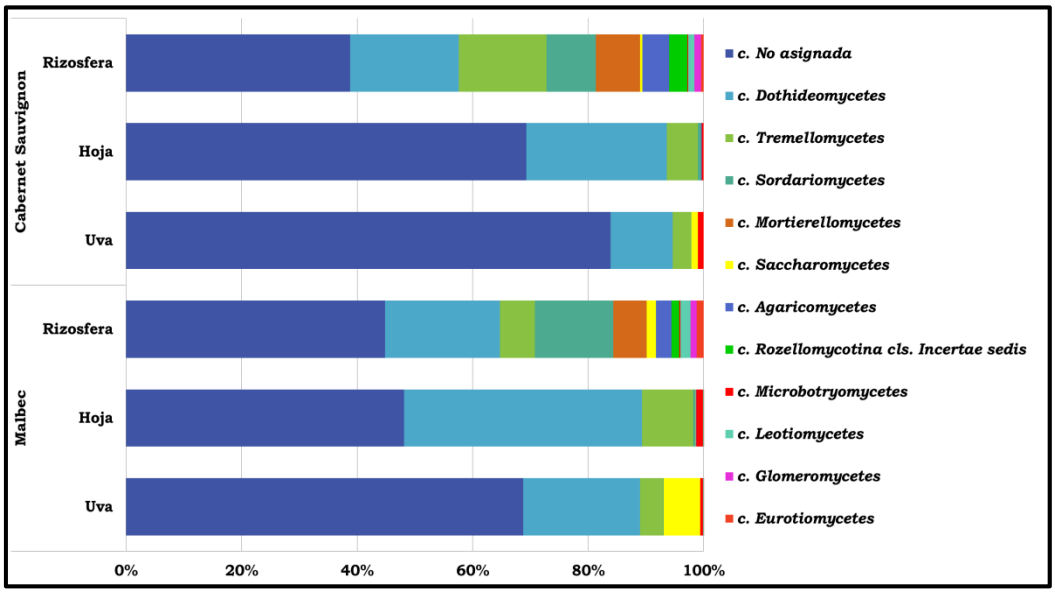

Figura II.6 Abundancia relativa de clases fúngicas en uvas, hojas y rizósfera, según varietal vínico.

En menores proporciones se identificaron los géneros *Fusarium* (<0,01% en uvas y hojas, 3,4% en rizósfera), *Mortierella* (<0,01% en uvas y hojas, 5,2% en rizósfera), *Naganishia*, *Didymella*, *Clitopilus*, *Coprinellus*, *Curvularia*, *Alternaria* y *Aspergillus*, con abundancias inferiores a 0,1% en uvas, hojas y rizósfera.

La presencia-ausencia de OTUs en distintos tejidos de la vid y en diferentes cultivares se evidenció mediante Diagramas de Venn (Figura II.7). La Figura II.7 muestra que 602 OTUs resultaron compartidas entre uvas, hojas y rizósfera, valor que corresponde al 17,1% del total de OTUs. La cantidad de OTUs exclusivas fue superior en rizósfera, representando el 63,9% del total, y probablemente se relaciona con la mayor diversidad taxonómica encontrada en este tejido.

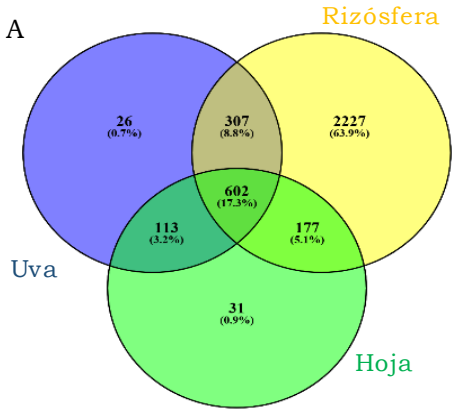

Figura II.7. Diagrama de Venn mostrando la cantidad de OTUs fúngicas compartidas (áreas superpuestas) entre uvas, hojas y rizósfera.

La comparación entre cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon mostró que, a nivel global, compartieron 2.259 OTUs, es decir, 64,9% de las OTUs identificadas (Figura II.8A). También se evaluó la cantidad de OTUs compartidas entre cultivares, por tipo de muestra. En las Figuras II.8B, II.8C y II.8D se observa que en uvas se compartieron 537 OTUs (51,1%), en hojas 524 (56,8%) y en rizósfera 1.217 (42,2%). La mayor cantidad de OTUs únicas se detectaron en Cabernet Sauvignon, en muestras de hojas (27,1%) y de rizósfera (22,2%). Las muestras de uvas presentaron mayor número de OTUs únicas en Malbec (28,9%) que en Cabernet Sauvignon (19,8%).

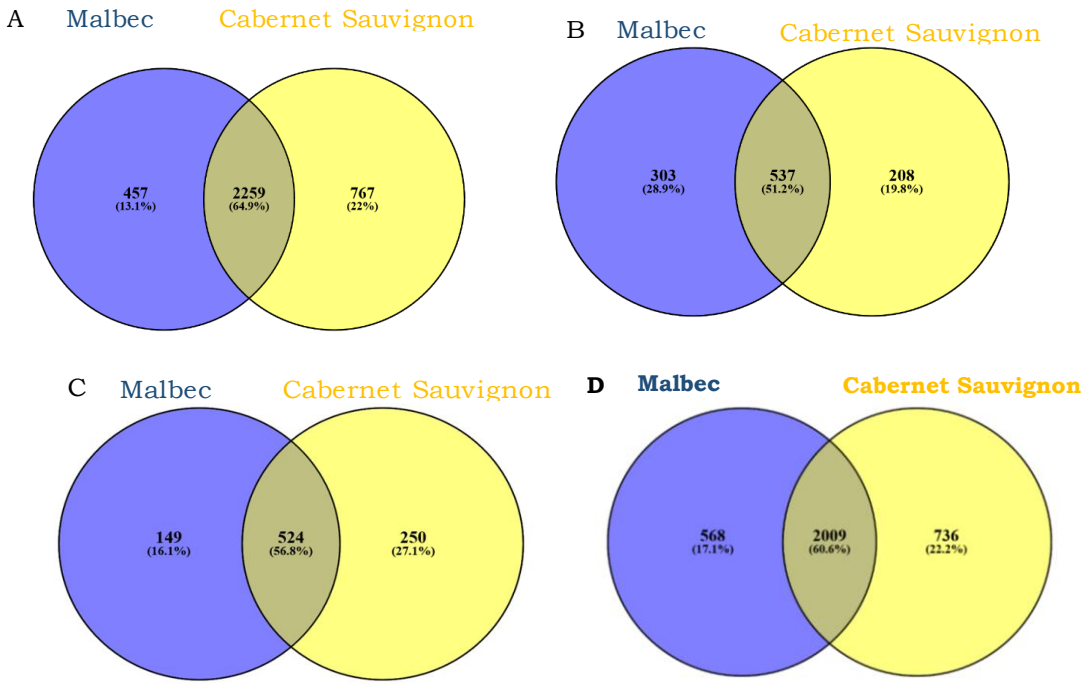

Figura II.8. Diagrama de Venn indicando cantidad de OTUs compartidas entre cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon. A: considerando el total de OTUs identificadas; B: OTUs identificadas en uvas; C: OTUs identificadas en hojas, y D: OTUs identificadas en rizósfera. Las áreas superpuestas corresponden a OTUs compartidas.

Para evaluar similitudes/diferencias entre poblaciones microbianas según hábitat de la vid, se implementó un análisis de *Escalamiento Multidimensional no-Métrico* (NMDS) utilizando la matriz de distancia de Bray-Curtis (Figura II.9). Este análisis evidenció mayor semejanza entre comunidades fúngicas de uvas y hojas entre sí que con las de rizósfera.

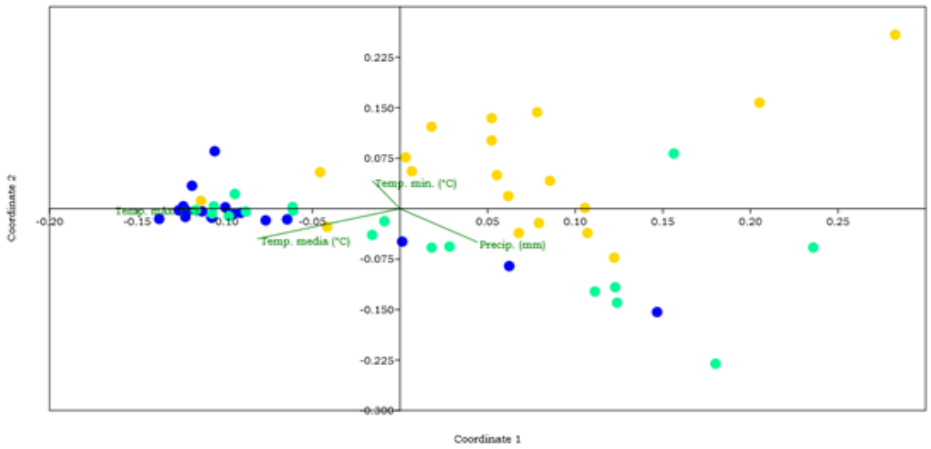

Figura II.9. Análisis de Escalamiento Multidimensional no-Métrico (NMDS) aplicando distancia de similitud de Bray-Curtis para clases fúngicas identificadas en uvas, hojas y rizósfera.

II.4. Discusión

Distintos factores geográficos y ambientales, como tipo de suelo y clima, inciden en la estrategia de manejo agrícola a adoptar para un viñedo (Burns et al. 2016). Estos factores pueden afectar la microbiota fúngica asociada de manera variable, según el tejido vegetal que habite. La rizósfera es una zona rica en nutrientes debido a que los exudados de las raíces (Nannipieri et al., 2007) poseen efectos estimulatorios sobre los microorganismos, los que a su vez aportan a la composición fisicoquímica de la zona radicular (Mukerji et al., 2006).

La filosfera está sometida a continuas fluctuaciones de radiación solar, temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes, factores que influyen en las comunidades microbianas asociadas (Lindow & Brandl, 2003; Rastogi et al., 2013). Las mismas consideraciones pueden hacerse extensivas a las poblaciones fúngicas de la superficie de las uvas (Pretorius et al., 2006, Gac & Ganga, 2007, Valero et al., 2007; Drumonde-Neves et al., 2017).

El propósito de este trabajo consistió en identificar aquellos factores con influencia en la estructura de las comunidades fúngicas asociadas a uvas, hojas y rizósfera, en viñedos con cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon, ubicados en diferentes zonas geográficas y con distintos manejos agronómicos. Mediante secuenciación masiva del espaciador ribosomal ITS1 se determinó el número de OTUs en las muestras obtenidas. A través del cálculo de Riqueza y del índice de Shannon, se pudo comprobar que la diversidad de las comunidades asociadas a rizósfera era superior a la hallada en las de uvas y hojas. Mediante cálculo del índice de Simpson, se halló que los valores inferiores correspondían a las muestras de hojas y uvas, otorgando así una mayor posibilidad de dominancia de una especie en las comunidades que habitan estas muestras.

El análisis de ß-diversidad, mediante NMDS, mostró que tanto el tipo de pie como el sistema de conducción empleados en el viñedo, influyen en la estructura de la comunidad fúngica. Con respecto al cultivar, se observó que resulta un factor importante para las comunidades fúngicas de hojas y uvas, pero no para las de rizósfera. Asimismo, se observó que se podía agrupar las muestras según las regiones geográficas de procedencia. Al respecto, las muestras procedentes de sitios de Argentina exhibieron una mayor similitud en los valores de diversidad, al igual que las de Europa, con la excepción, en este caso, de las muestras de hojas.

Estos resultados permitieron corroborar el vínculo entre las características ambientales, el manejo agronómico del viñedo, el cultivar vínico y las comunidades fúngicas asociadas a diferentes tejidos de la vid. De acuerdo a Zarraonaindia et al. (2015), es posible detectar similitudes entre comunidades fúngicas de distinto origen geográfico, si bien el tipo de tejido vegetal que habitan (uvas, hojas y/o rizósfera) es la variable más significativa en relación a la diversidad. Esto se pudo comprobar en el presente trabajo, al evaluar la distribución (ß-diversidad) mediante NMDS, y observar que en muestras del mismo tipo este valor tendía a estar más relacionado.

El análisis taxonómico permitió comprobar que ciertos taxones fúngicos resultan omnipresentes en los viñedos, situación previamente descripta para viñedos situados en sitios cercanos (Setati et al., 2012; Gilbert et al., 2014; Salvetti et al., 2016). La identidad de poblaciones fúngicas ha sido posible gracias a los avances de las herramientas moleculares. La región espaciadora interna (ITS) se ha convertido en el marcador oficial de las poblaciones de hongos, acordado por 37 micólogos de12 países durante el *Smithsonian's Conservation and Research Centre*, Front Royal, Virginia, USA en mayo de 2007 (Bellemain, 2010). La base de datos International Nucleotide Sequence Databases en conjunto con otras bases de datos, contiene al menos 100.000 secuencias ITS fúngicas derivadas de secuenciación de DNA convencional por Sanger (Nilsson et al., 2009; Bellemain et al., 2010). Sin embargo, aún existen errores en la identificación fúngica como consecuencia de problemas técnicos (Nilsson et al., 2006; Bellemain et al., 2010).

Los filos descriptos como más abundantes en suelos agrícolas son *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Hardoim et al., 2015; Toju et al., 2013; Jumpponen et al., 2014; Hassani et al., 2018). En el presente estudio se identificaron como predominantes las clases *Dothideomycetes* (*Ascomycota*) (más abundante en hojas) y *Tremellomycetes* (*Basidiomycota)* (más abundante en rizósfera). También se evidenció la presencia de géneros fúngicos compartidos por diferentes tejidos de la vid, *Vishniacozyma*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Naganishia*, *Didymella*, *Clitopilus*, *Coprinellus*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Aspergillus* (el más abundante en la mayoría de las muestras), y *Aureobasidium*. *Alternaria* y *Aspergillus*, géneros responsables de causar la podredumbre de las uvas en etapas previas a la cosecha (Fleet, 1999; Magnoli et al, 2003), sólo se hallaron en una abundancia inferior al 1%. La cepa *Aspergillus carbonarius*, es productora de ocratoxina A (OTA), que posee

potencial carcinogénico en humanos y puede encontrarse en ciertos alimentos y en vinos (Felice et al., 2008). Por otra parte, el género *Aureobasidium* resulta de interés biotecnológico para viñedos y bodegas, dado que se ha demostrado que cepas de *A. pullulans* pueden desarrollar funciones como agentes de biocontrol contra *Penicillium digitatum* en cítricos y manzanos, y contra *A. carbonarius* en uvas (Varela & Borneman, 2017). En bodegas, su aplicación incluye la producción de pectinasas, empleadas para la clarificación de vinos (Varela & Borneman, 2017), y de β-glucosidasas, para la mejora del aroma (Baffi et al., 2011; Varela & Borneman, 2017).

Sorprendentemente, los géneros de levaduras *Hanseniaspora* y *Saccharomyces*, sólo pudieron hallarse en uvas y rizósfera, respectivamente. Ambos géneros son de relevancia para la industria vitivinícola; *Hanseniaspora* por su capacidad de potenciar la producción de compuestos aromáticos en vino, como los ésteres (Escalante et al., 2011; Jara et al., 2016), y *Saccharomyces* por su capacidad fermentadora y tolerancia a elevados niveles de etanol (Ribereau-Gayon et al., 2006; Jara et al., 2016).

Resulta clara la importancia de identificar aquellos integrantes de comunidades microbianas asociadas a la vid que en contacto con el mosto puedan influir en el desarrollo de aromas y sabores en el vino producido (Setati et al., 2012; Martins et al., 2012; Martins et al., 2014; Bokulich et al., 2016; Grangeteau et al., 2016; Portillo et al., 2016; Salvetti et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Vitulo et al., 2019). Así como conocer la variedad de hongos y su función en los viñedos, para hallar aquéllos con capacidad de incrementar la resistencia de las vides a patógenos, o generar tolerancias a situaciones de estrés, o influir en la producción de metabolitos con consecuencias en la calidad del vino (Grangeteau et al., 2016; Mezzasalma et al., 2017, 2018).

Los resultados alcanzados confirman el impacto de ciertos factores biogeográficos y agrícolas en la estructura y diversidad de las comunidades fúngicas epífitas que habitan hojas, uvas y rizósfera, y aportan conocimiento sobre el complejo ecosistema del que forman parte viabilizando, a futuro, la posibilidad de explotar su potencial biotecnológico para bodegas y viñedos.

II.5 Material Suplementario

Tabla II.S1. Resumen de datos de secuenciación de la región ITS1 en muestras de uvas, hojas y rizósfera de vides.

	Uva	Hoja	Rizosfera
No. de sitios	19	19	19
No. de Muestras Iniciales	60	57	57
No. muestras	46	41	50
No. observaciones OTUs	1048	923	3313
Suma total reads	3410926	2391164	3467815
Suma de Reads Normalizacion	1057034	341694	325700
Suma/muestra resumen			
Min	22979	8334	6514
Max	143044	232588	212851
Media	74729.5	50073	73286.5
Mean	74150.56522	58321.07317	69356.3
STD. DEV	24662.55275	38589.48061	34269.77045

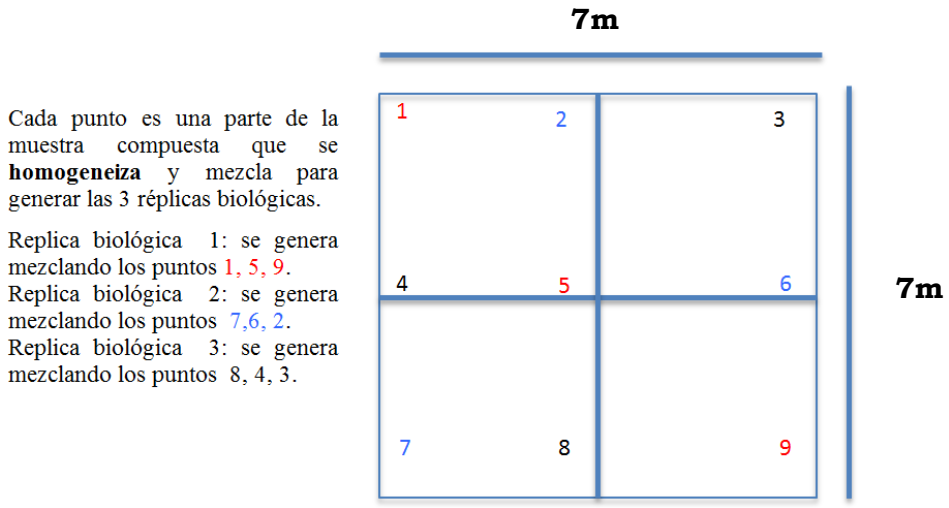

Figura II.S1. Esquema de toma de muestras adaptado de Paetz, et al., (2005)

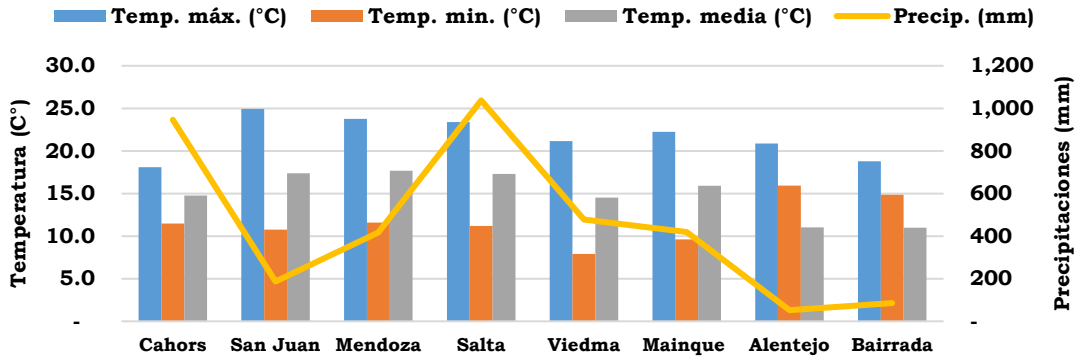

Figura II.S2. Temperaturas y precipitaciones anuales de las distintas regiones muestreadas en Francia, Argentina y Portugal. Datos extraídos a partir de http://www.es.weatherspark.com, http://www.climate data.org, http://www.meteo-net.com y del Instituto de Clima y Agua (agrometeorología) CRN - CNIA-INTA, Castelar.

Capítulo III. Caracterización de la diversidad de la microbiota asociada a la rizósfera de la vid en función del año de vendimia, finca y cultivar

III.1 Introducción

La actividad y diversidad de la microbiota resultan condicionantes de la fertilidad, estabilidad y funcionamiento de ecosistemas y agroecosistemas. La diversidad microbiana es esencial para garantizar los ciclos de nutrientes y los procesos de descomposición vegetal en cualquier ecosistema terrestre, mediante oxidación, reducción, descomposición de materia orgánica y mineralización, así como por interacciones inter e intra-específicas reguladas por los microorganismos que habitan el nicho. Profundizar el conocimiento de la diversidad microbiana constituye una de las líneas de investigación más relevantes de la ecología, dados sus múltiples aportes al conocimiento de la función, estructura, evolución y relación de las poblaciones que la componen (Acinas, 2007; Lopez-Reyes et al., 2015; Cadena-Zamudio et al., 2016). El trabajo con microorganismos resulta dificultoso dado que, en su mayoría, al no hallarse en condiciones similares a las de sus ecosistemas naturales, no pueden cultivarse *in vitro*. Se estima que más del 99% de la comunidad microbiana de un determinado ambiente no resulta accesible por los métodos tradicionales de la microbiología: aislamiento y caracterización bioquímica y metabólica.

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular para analizar comunidades microbianas o microbiomas de diferentes nichos ecológicos se ha convertido en una herramienta muy importante, ya que permite estudiar con mayor detalle su estructura y la función que desempeñan en el ambiente, bajo condiciones naturales (Metzker, 2010; Schmeisser et al., 2007). Los métodos basados en análisis de DNA o RNA constituyen herramientas útiles para la amplificación de blancos moleculares en comunidades, y permiten detectar e identificar microorganismos, o indagar la funcionalidad de ciertos genes relacionados a su metabolismo (Wang & Chang, 2011; Zelicourt et al., 2013; Carvalhais et al., 2013; Dey et al., 2014).

Las comunidades microbianas también se estudian aplicando un enfoque metagenómico, que proporciona mayor cantidad de datos a procesar (Giga o Terabases de nucleótidos), dado que los mismos corresponden al total de los organismos existentes en determinado nicho ecológico (Edwards et al., 2013; Shakya et al., 2013; Bulgarelli et al., 2015). Los enfoques metagenómicos resultaron impulsados por los avances en la secuenciación masiva de ácidos nucleicos, que proporciona información tanto de los microorganismos cultivables como de los no cultivables, en diversos ambientes, así como en la detección de genes asociados a la biosíntesis de enzimas, proteínas u otros metabolitos relevantes, con aplicación

biotecnológica o con beneficio en actividades humanas diversas (Lorenz & Eck, 2005; Ghazanfar et al., 2009; Sudan & Vakhlu, 2015). La mayor ventaja de la metagenómica es brindar información sobre la estructura de las comunidades microbianas (riqueza y distribución), sus genomas, y realizar diversos análisis: funcionalidad de genes, proteínas, enzimas y metabolitos secundarios, filogenéticos y taxonómicos a nivel de especie, y de transferencia horizontal de genes entre microorganismos (bacterias, hongos, arqueas y virus) (Hugenholtz & Tyson, 2008).

Al microbioma de las plantas, compuesto por diversos grupos de hongos, bacterias, arqueas, *oomycetes* y virus, se lo considera como una extensión genómica del organismo hospedador, ya que cumple múltiples funciones que resultan clave para la sanidad y productividad vegetal (Mendes et al., 2011; Berendsen et al., 2012; Turner et al., 2013; Berg et al., 2014; Beckers et al., 2017). En particular, el microbioma de la vid (*Vitis vinífera*) es un consorcio conformado por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, sobre el cual impactan diversos factores, tanto bióticos como abióticos, de importancia para las características regionales de los vinos (Setati et al., 2012; Bokulich et al., 2014; Morgan et al., 2017). La diversidad de microorganismos varía en los distintos órganos de la planta de vid, siendo mayor en el tallo y superior aún en el suelo adyacente a las raíces de la planta (rizósfera) (Martins et al., 2013). La dinámica microbiana del suelo es de las más complejas, particularmente la del suelo rizosférico, dada la cantidad de exudados liberados por las plantas que aportan nutrientes y promueven la selectividad y competencia entre microorganismos (Philippot et al., 2013)

Muchas prácticas de manejo, propias de los viñedos, también influyen en las características del suelo, modulando los sistemas radiculares de las plantas e impactando en las comunidades microbianas asociadas a este nicho ecológico. Asimismo, los microorganismos rizosféricos influyen en las microbiotas asociadas a otras estructuras de la planta (Zarraonaindia et al., 2015). Por esto, el sistema radicular resulta un jugador clave en la definición de las comunidades bacterianas asociadas a la planta, contribuyendo al *terroir* microbiano de la fruta y de los productos de la vid. En este sentido, su caracterización conlleva la ventaja de identificar microorganismos como marcadores biológicos del *terroir* (Bokulich et al., 2014; Knight et al., 2015), que establecen una marca o impronta que resulta trascendental en la identificación de los vinos y que está dada por la presencia de metabolitos secundarios derivados de las actividades bacterianas y fúngicas en los viñedos (Pinto et al., 2014; Belda et al., 2017). Dichos microorganismos condicionan la calidad de la uva y de los consecuentes procesos fermentativos del mosto y del

vino (Mezzasalma et al., 2017). Para comprender los roles cruciales de los microorganismos en el proceso completo de elaboración del vino, debemos conocer sus nichos ecológicos, su dinámica poblacional y las relaciones entre "microbioma - sanidad de la vid" y "microbioma - metaboloma del vino", que constituyen etapas críticas para el diseño de prácticas enológicas de precisión (Belda et al., 2017).

En este contexto se realizaron numerosos esfuerzos para comprender la dependencia de la estructura de los microbiomas de factores como clima, tipo de suelo, cultivar de uva y manejo agronómico del viñedo (Setati et al., 2012; Zarraonaindia et al., 2015; Burns et al., 2016; Morgan et al., 2017). Los microorganismos del suelo pueden verse afectados por factores abióticos (temperatura, altitud, humedad y nutrientes del suelo) y por factores bióticos (interacciones con otros microorganismos) (Corneo et al., 2013). Del mismo modo, Marasco et al., (2018) mostraron que cambios en el genotipo de la planta pueden afectar el sistema radicular de las vides y, consecuentemente, al microbioma rizosférico. Otros autores hallaron que ciertas prácticas de intervención humana, como la labranza, pueden modificar la disponibilidad de materia orgánica, estructura y nutrientes del suelo, cambios que afectan la composición microbiana nativa (Vega-Avila et al., 2014; Setati et al., 2015; Burns et al., 2016), que también puede estar condicionada por el valor del pH del suelo (Steenwerth et al., 2008).

Si bien se conoce la importancia de los microorganismos en la conservación del equilibrio de los ecosistemas, aún resultan escasos los estudios sobre la variabilidad de las comunidades en condiciones naturales. Dada la importancia económica y cultural de la explotación de la vid para la elaboración de vino, resulta necesario comprender los distintos factores que afectan la asociación de los microorganismos con este cultivo.

Según la OIV, en 2017 el 45 % de la producción mundial de uva se destinó a la elaboración de vino y el 63% en el 2018. La producción vitivinícola en San Juan está centrada en los valles de Tulum, Ullum, Zonda y Pedernal, cuyas alturas varían entre 550 y 1300 msnm, con precipitaciones anuales promedio de 145 mm, siendo necesario el riego superficial por surcos y (Ministerio de Agroindustria, 2016). Este riego impactó en el volumen radicular de las vides, y causó cambios drásticos en los patrones de distribución microbiológica (Sandor & Homburg, 2017). Los suelos resultan bastante heterogéneos, siendo pobres en algunas zonas y fértiles en otras.

El presente estudio se enfocó en la caracterización de las comunidades microbianas de viñedos de cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon ubicados en el Valle de Ullum, provincia de San Juan. Dada la importancia de la microbiota en el

equilibrio de los ecosistemas y en la productividad de los mismos, el estudio se llevó a cabo durante tres vendimias consecutivas (2015, 2016 y 2017). Se realizó aplicando técnicas independientes de cultivo, mediante la amplificación del marcador ITS1 para determinar la microbiota fúngica y del gen *16S rRNA* (región hipervariable (V3-V4) para la población procariota, en muestras rizosféricas obtenidas en la etapa previa a las cosechas. Los datos relevados permitieron evaluar y analizar la influencia de las variables más significativas en la modulación de las comunidades microbianas presentes.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Toma de muestras

Se recogieron muestras en 2 fincas del Valle de Ullum, provincia de San Juan, separadas 6 km una de otra, Finca Norte (FN) y Finca Arriba (FA). Se cultivan principalmente los varietales Malbec (MA) y Cabernet Sauvignon (CA), sin portainjerto, y ambos viñedos se manejan en condiciones similares. Las muestras de rizósfera se recogieron en la semana previa a las cosechas 2015, 2016 y 2017 (Tabla III.1), a una distancia mínima de 7 m de los bordes de cada parcela, a partir de 9 plantas limitadas a un cuadrante de 49 m^2 .

Tabla III. 1. Sitios de toma de muestras, ubicación y varietal

Muestra	**Sitio**	**Varietal**	**Ubicación**	**msnm**
FNMA	Finca Norte	Malbec	S 31° 27.114' w068° 42.523'	780
FNCA	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	S 31° 27.002' w068° 42.109'	770
FAMA	Finca Arriba	Malbec	S 31° 28.407' w068° 45.486'	800
FACA	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	S 31° 28.407' w068° 45.347'	800

El suelo se recolectó a 30 cm de profundidad, con pala desinfectada, y a unos 20 a 30 cm del tallo hacia el interior de la entrefila. Las muestras se homogeneizaron,

tamizaron y una porción se utilizó para su análisis fisicoquímico. Se guardaron en bolsas estériles, etiquetadas según orden y número establecido en la Figura II.S1. Las muestras se agruparon para obtener tres (3) réplicas por sitio y año (4 sitios, 3 réplicas, 3 años)(Paetz et al., 2005), resultando finalmente 12 muestras, a las que se denominó con las 2 letras indicativas de la finca (FN o FA), las 2 letras del varietal (MA o CA) y el año. A modo de ejemplo, la muestra FAMA15, corresponde a Finca Arriba–Malbec-2015. Las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio y se mantuvieron a -20 ºC hasta ser analizadas.

III.2.2. Preparación de muestras de rizósfera y extracción de DNA

Las raíces se removieron manualmente y se obtuvo el suelo adherido a las mismas en condiciones de esterilidad; en algunos casos resultó necesario ayudarse con pinzas y bisturí. Para eliminar los posibles restos de raíz, las muestras se tamizaron (tamaño de poros 0.5 mm^2). La extracción de DNA se realizó a partir de 0,4 g de suelo rizosférico, utilizando el kit FastDNA SPIN Kit *for soil* (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA), y siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA extraído se cuantificó mediante fluorómetro Qubit®2.0 155 (Thermo Scientific™). Para la evaluación de la pureza se midieron las relaciones de absorbancia espectrofotométrica 260/280 nm y 260/230 nm, respectivamente. Una relación a 260/280 > 1.8 indica un DNA de pureza aceptable en relación a la presencia de proteínas, RNA y compuestos aromáticos; una relación a 260/230 con valores de 2.0 a 2.2, indican ausencia de contaminación con sales, carbohidratos y fenoles.

III.2.3. Amplificación y secuenciación de las muestras de DNA

La diversidad de eubacterias y archeas en cada muestra de DNA se analizó mediante amplificación de la región hipervariable V3-V4 del gen *16S rRNA*, utilizando los *primers* 341F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAYGGGR BGCASCAG) and 806R (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACT ACNNGGGTATCTAAT), (amplicón de ~465 pb) (Hansen et al., 2012; Gobbi et al., 2018). La construcción de bibliotecas se realizó mediante doble PCR, y de acuerdo a protocolos descriptos en Feld et al., (2016) y Gobbi et al., (2018). La diversidad de levaduras se analizó amplificando la región correspondiente al espaciador eucariota ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*), ubicada entre los genes ribosomales *18S rRNA* y *5.8S rRNA*), mediante los *primers* ITS1F (5′-ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′) and

ITS2 (5′-BGCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′)(Wang et al., 2017)**.** Las reacciones de secuenciación se realizaron con la tecnología Illumina MiSeq.

La doble amplificación se realizó como se describe a continuación. En la primera PCR, en un volumen final de 25 µL, la mezcla contenía: 12 µL de AccuPrime™ SuperMix II (Thermo Scientific™), 0.5 µL de seroalbúmina bovina (BSA) (concentración final de 0.025 mg/mL), 0.5 µL de los *primers* completos directo y reverso (stock de 10 µM), 1.5 µL H_2O estéril y 5 µL de DNA molde. Esta mezcla de reacción se sometió a una pre-incubación a 95 °C por 2 min, seguida de 33 ciclos de 95 °C por 15 seg, 55 °C por 15 seg, 68 °C por 40 seg, y de una extensión final a 68 °C por 4 min. El DNA total se cuantificó mediante fluorómetro Qubit®2.0 155 (Thermo Scientific™).

La segunda PCR tuvo por objeto adicionar etiquetas (*indizar*) a cada amplicón obtenido en la primera PCR. Se empleó un volumen final de reacción de 28 µL, que contenía 12 µL de AccuPrime™SuperMix II (Thermo Scientific™), 2 µL de *primers* con las secuencias etiquetas (index) y extremos adaptadores para *Illumina* P7/P5, 7 µL H_2O estéril y 5 µL de amplicones de la primera PCR. Las condiciones de ciclado consistieron en: desnaturalización a 98 °C durante 1 min, seguida de 13 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 seg, hibridación a 55 °C por 20 seg y extensión a 68 °C por 40 seg, con una extensión final a 68 °C por 5 min. En ambos casos, los productos de PCR se controlaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,5%.

La purificación de los productos de esta segunda PCR (limpieza de dímeros y componentes de la reacción de PCR) se realizó con HighPrep™ PCR (MAGBIO), que adhiere selectivamente los fragmentos de DNA a secuenciar El DNA indexado se cuantificó mediante fluorómetro Qubit®2.0 155 (ThermoScientific™). A continuación, las mezclaron en cantidades equimolares de 10 ng/µl y se secuenciaron mediante IlluminaMiSeq, utilizando lecturas pareadas de 2 x 250 con V2 Chemistry (Gobbi et al., 2018).

III.2.4. Procesamiento de datos de secuenciación

El *demultiplexing* de las lecturas se realizó con el *software* bcl2fastq V.2.17.1.14 (Illumina). Los adaptadores de las secuencias de *Illumina* fueron eliminados con el *software* Trim Galore v0.4. https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore.git mediante el cutadapt v1.8.3 (M. Martin, 2011). Las secuencias de *primers* se eliminaron desde el extremo 5' de cada lectura que forman un par y los pares de lecturas sin *primers* discernibles se descartaron utilizando un *script* en Biopython.

Las lecturas se procesaron de acuerdo a la plataforma UPARSE utilizando USEARCH V.10.0.240_i86linux64 (Edgar, 2013) con las siguientes diferencias: (i) el paso de filtrado de calidad y corte de longitud de las lecturas fue reemplazado con una estrategia alternativa de filtrado de calidad (usearch –fastq_filter –maxee 1.0) (Edgar & Flyvbjerg, 2015), (ii) para los datos de *16s rRNA*, en el proceso de unión o *merging* de lecturas, aquellas fuera del rango de 373 pb a 453 pb se descartaron, y (iii) el *clustering* de lecturas en *Unidades Taxonómicas Operativas* (OTUs por sus siglas en inglés) se realizó con la función unoise3 de USEARCH. Las tablas de OTUs se construyeron aplicando la función *otutab* de USEARCH.

Las muestras asignadas en OTUs con menos de 5000 lecturas fueron descartadas. La taxonomía asignada a cada OTU se ejecutó con la función *sintax* (Edgar, 2016) de USEARCH, empleando como referencia, la base de datos *Ribosomal Database Project Reference 16s Training Set* con el nombre de especies (V.16) y la *Utax Reference Dataset* v7.2 (UNITE Community 2017): lanzamiento UNITE USEARCH/UTAX, Version 01.12.2017. UNITE Community. https://doi.org/10.15156/BIO/587476 para el análisis de los datos *16s rRNA* e ITS1. Las OTUs clasificadas como cloroplastos se descartaron Seguidamente, se descartaron aquellas OTUs que no contabilizaron al menos 30 lecturas o el 0,5% o más de lecturas, en al menos una de las muestras. Los arboles de OTUs se construyeron empleando la función *cluster_agg* (Edgar, 2010) de USEARCH.

Estos datos luego se procesaron mediante la plataforma Rhea (Lagkouvardos et al., 2017), basada en lenguaje de programación R, que permite la normalización de lecturas para calcular α- y β-diversidad, agrupación y asignación taxonómica, comparación de grupos en serie, correlación entre datos y análisis estadísticos (la significación estadística se estableció en $p \leq 0.05$; se muestran los valores de p menores a 0.05). Adicionalmente, los datos se analizaron con los programas QIIME 2 v. 2017.9 (Caporaso et al., 2010) y PAST v.3 (Hammer et al., 2001).

Alfa-diversidad (α-diversidad) se refiere a la diversidad intra-muestra; Riqueza da cuenta del número de OTUs en una muestra; Índice de Diversidad estima el número de especies iguales en una muestra; Índice de Simpson se relaciona con Dominancia; Índice de Shannon se relaciona con Riqueza y Equidad. Para evitar estimaciones incorrectas de la Riqueza de especies debidas a la profundidad de secuenciación, Rhea sólo considera los recuentos normalizados superiores a 0,5. Para el análisis del perfil microbiano se comparó la composición *alfa* mediante un

análisis de varianza ANOVA (Hammer et al., 2001). Para la comparación de las muestras de a pares se utilizó el *Tukey Pairwise* (Olleveant, 1999).

Para evaluar la β-diversidad (diversidad entre muestras) se calcularon las distancias ecológicas UniFrac entre muestras en base a un umbral de 97% de similitud entre OTUs. A partir del cálculo de distancias UniFrac generalizado (ponderación entre pesado y no pesado), se realizaron análisis NMDS y prueba PERMANOVA, para determinar diferencias estadísticamente significativas.

III.2.5. Caracterización fisicoquímica de suelos

La caracterización fisicoquímica de los suelos se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA – INTA) en Buenos Aires, donde el suelo se secó a 40 °C y luego se desagregó y tamizó según las normas de pretratamiento para análisis agropecuario (Norma IRAM-SAGPyA 29578: 2009), en ISO 11464 - *Soil Quality. Pretreatment of Samples for Physico-chemical Analysis* (Marban, 2005). Se valoraron los siguientes parámetros, siempre de acuerdo a las normas IRAM correspondientes: pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo extraíble, y textura.

III.3. Resultados

III.3.1. Características climáticas del Valle de Ullum y propiedades fisicoquímicas de suelos

El Valle de Ullum se ubica en la zona centro sur de la provincia de San Juan y está rodeado por sierras al N, E y O, mientras que al S se ubica el río San Juan, formando el Embalse Ullum. El clima es desértico, con escasas precipitaciones, aridez considerable e importante amplitud térmica diaria y anual. Las temperaturas promedio oscilan entre los 27 °C en verano y los 8 °C en invierno, no registrándose precipitaciones mensuales superiores a 20 mm. En los años de recolección de muestras, los promedios anuales de temperatura, registradas por la EEA INTA San Juan, resultaron de 10,9 °C en 2015, 11,0 °C en 2016 y 10,7 °C en 2017, con precipitaciones variables, siendo 2016 el año con mayor registro (128 mm).

Asimismo, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los suelos muestreados (Tabla III.2). Según los análisis, todos los sitios registraron suelos de tipo *franco*, con pH ligeramente alcalino, y valores de alcalinidad superiores en Finca Norte (FN) (8,33, 8,16, 8,25, 8,34, 8,29 y 8,63).

Tabla III. 2. Propiedades fisicoquímicas de suelos rizosféricos de viñedos.

Muestra	Arcilla (%p/p)	Limo (%p/p)	Arena (%p/p)	pH	Materia orgánica (% p/p)	Carbono orgánico (% p/p)	Nitrógeno orgánico (% p/p)	Relación C/N	Fósforo asimilable (mg/kg)
FNMA15	24,80	50,30	21,60	8,33	1,34	0,78	0,08	9,75	5,80
FNCA15	20,10	59,10	18,50	8,16	1,67	0,97	0,10	9,70	8,60
FAMA15	28,00	47,40	23,10	8,07	2,40	1,39	0,12	11,58	71,30
FACA15	17,80	56,90	22,50	8,14	1,81	1,05	0,10	10,50	50,80
FNMA16	20,40	45,40	32,80	8,25	1,97	1,14	0,13	8,77	13,70
FNCA16	18,80	34,40	45,30	8,34	1,41	0,82	0,08	10,25	9,70
FAMA16	25,20	45,80	26,10	7,98	2,84	1,65	0,15	11,00	25,50
FACA16	23,30	45,90	28,00	8,11	2,50	1,45	0,15	9,67	22,30
FNMA17	21,60	45,90	28,80	8,29	1,38	0,80	0,09	8,89	5,90
FNCA17	17,20	41,30	37,10	8,63	1,48	0,86	0,08	10,75	8,50
FAMA17	26,70	43,50	27,60	7,99	2,50	1,45	0,14	10,36	28,90
FACA17	28,40	43,00	26,50	7,92	2,21	1,28	0,11	11,64	24,60

El menor valor de pH correspondió a FACA17 (7,92) y el mayor a FNCA17 (8,63). El contenido de materia orgánica resultó superior en FA, siendo FAMA16 (2,84% p/p) la muestra que mostró el valor superior y FNMA15 (1,34% p/p) la de valor inferior. Similar comportamiento se observó en el contenido de carbono y nitrógeno orgánicos, y en el de fósforo asimilable (Tabla III.2). Para una mejor visualización de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir de una matriz de correlación (Figura III.1), en ambas Fincas (FN y FA). Dicho análisis permitió distinguir FN de FA; los contenidos de materia orgánica, carbono y nitrógeno orgánicos, relación C/N, fósforo asimilable y arcilla, resultaron relevantes para FA. El valor de pH, en cambio, fue determinante para FN.

III.3.2. Análisis de datos de secuenciación de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA y de la región espaciadora ribosomal ITS1

Como se mencionó, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la comunidad microbiana rizosférica de vides Malbec y Cabernet Sauvignon durante 3 años consecutivos, utilizando un enfoque independiente de cultivo. Para ello se realizó la secuenciación masiva de la región variable V3-V4 del gen *16S rRNA*, como marcador de la comunidad procariota, y de la región espaciadora ribosomal ITS1,

como marcador de la comunidad fúngica. Se partió de un total de 36 muestras (4 sitios, 3 réplicas, 3 años) de suelo rizosférico, 6 correspondientes al cultivar Malbec y 6 al cultivar Cabernet Sauvignon.

Del total, se lograron amplificar 34 muestras para el análisis de la comunidad fúngica, obteniendo un total de 2.751.340 lecturas que superaron los filtros de calidad, con valores lecturas/muestra entre 19.107 y 202.851. En el caso del análisis de la comunidad procariota (bacterias y arqueas), se amplificaron 29 muestras, generando un total de 537.607 lecturas que superaron los filtros de calidad, con valores lecturas/muestra entre 5.924 y 64.257 (Tabla III.S1).

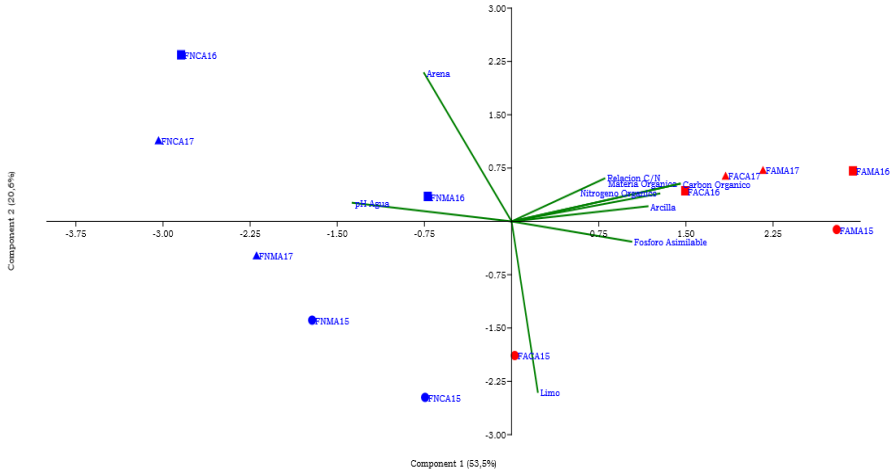

Figura III. 1. Análisis de Componentes Principales (PCA) de las propiedades fisicoquímicas de suelos en Finca Norte y Finca Arriba, en los tres años muestreados.

La diversidad de poblaciones eucariota y procariota se comparó entre muestras mediante el análisis de curvas de rarefacción (Figura III.2). La estabilización de dichas curvas resulta indicativa que la muestra se acerca a la saturación (Rodriguez & Konstantinidis, 2014), proporcionando una medida de la profundidad de los experimentos. Para ambos marcadores empleados, las curvas de rarefacción indicaron una buena cobertura de las comunidades, asegurando una valiosa representación de diversidad y clasificación taxonómica en los resultados. En estudios posteriores se trabajó con 19.000 secuencias para hongos y 5.000 para procariotas.

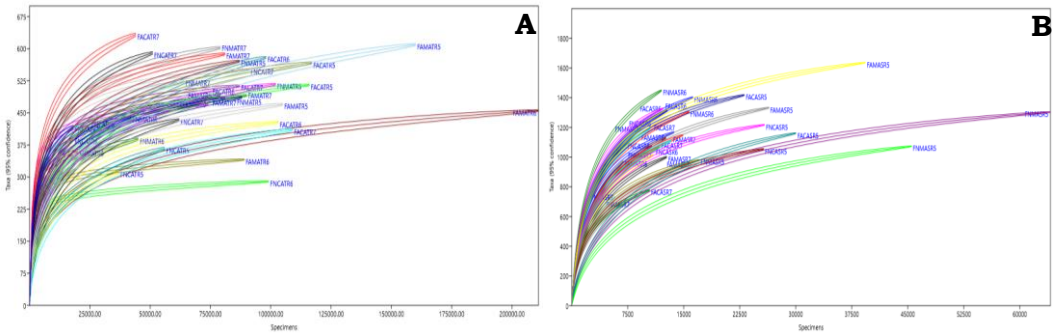

Figura III. 2. Análisis de rarefacción de estimaciones de Riqueza en las comunidades microbianas evaluadas. A: comunidad fúngica (espaciador ITS1); B: comunidad procariota (V3-V4 *16S rRNA*).

III.3.3. Análisis de riqueza y diversidad en las comunidades microbianas rizosféricas

Para iniciar el análisis de diversidad, se evaluó la Riqueza (número de OTUs - *Operational Taxonomic Units*) y se calcularon los Índices de Diversidad de Shannon (H') y de Simpson (1-D). Previo a la agrupación en OTUs se eliminaron las secuencias correspondientes a mitocondrias, cloroplastos y las posibles quimeras. Para las comunidades fúngicas se obtuvo un total de 2.863 OTUs y para las procariotas un total de 2.810 OTUs, con un valor de 97% de identidad de nucleótidos. Los valores de Riqueza oscilaron entre 1.117 y 641 para procariotas y entre 447 y 298 para hongos (Tabla III.3).

El Índice de Shannon varió entre 2,53 y 4,35 para hongos y entre 3,88 y 6,36 para procariotas. En la mayoría de los ecosistemas naturales, el Índice de Shannon para procariotas varía entre 0,5 y 5, siendo su valor normal 2 a 3; valores inferiores a 2 implican baja diversidad de especies y superiores a 3, elevada diversidad. Respecto al Índice de Simpson (1-D) sus valores oscilaron entre 0,698 y 0,969 y 0,786 y 0,996 para hongos y procariotas, respectivamente. Valores elevados de 1-D sugieren una distribución relativamente uniforme de especies en las muestras, sin que ninguna resulte dominante.

Otro índice cuyo cálculo resulta interesante es Chao1, que estima el número real de especies (OTUs) en una muestra dada, considerando la abundancia de las únicas (singletones) (especies representadas por 1 individuo) y las dobles (dobletones) (especies representadas por 2 individuos) (Colwell & Coddington, 1994).

Tabla III.3. Riqueza y diversidad del microbioma de rizósfera basado en datos de secuenciación de comunidades procariotas (región V3-V4 del gen *16S rRNA*) y fúngicas (espaciador ITS1).

Muestra	Marcador	**Riqueza (S)**	**Índice Simpson 1-D**	**Índice Shannon**
FNMA15	16S	641 ± 120	0,786 ± 0,273	3,877 ± 1,706
	ITS	385 ± 30	0,878 ± 0,035	3,297 ± 0,223
FNCA15	16S	782 ± 129	0,992 ± 0,004	5,723 ± 0,372
	ITS	298 ± 23	0,863 ± 0,007	2,903 ± 0,171
FAMA15	16S	988 ± 122	0,992 ± 0,001	5,948 ± 0,307
	ITS	365 ± 21	0,812 ± 0,037	2,884 ± 0,409
FACA15	16S	912 ± 354	0,982 ± 0,019	5,404 ± 1,252
	ITS	372 ± 14	0,895 ± 0,038	3,388 ± 0,244
FNMA16	16S	1068 ± 50	0,996 ± 0,001	6,362 ± 0,166
	ITS	360 ± 25	0,969 ± 0,015	4,349 ± 0,399
FNCA16	16S	1117 ± 73	0,993 ± 0,002	5,933 ± 0,194
	ITS	358 ± 91	0,907 ± 0,087	3,960 ± 0,606
FAMA16	16S	907 ± 100	0,980 ± 0,008	5,633 ± 0,103
	ITS	333 ± 86	0,905 ± 0,109	3,778 ± 1,135
FACA16	16S	1019 ± 49	0,995 ± 0,001	6,259 ± 0,111
	ITS	353 ± 28	0,722 ± 0,213	2,527 ± 0,751
FNMA17	16S	978 ± 243	0,991 ± 0,003	5,690 ± 0,340
	ITS	447 ± 29	0,927 ± 0,008	3,913 ± 0,094
FNCA17	16S	736	0,991	5,580
	ITS	446 ± 79	0,758 ± 0,282	3,088 ± 1,436
FAMA17	16S	771 ± 81	0,987 ± 0,005	5,580 ± 0,231
	ITS	429 ± 50	0,943 ± 0,031	3,994 ± 0,324
FACA17	16S	839 ± 78	0,993 ± 0,001	5,844 ± 0,266
	ITS	419 ± 128	0,698 ± 0,356	2,974 ± 1,739

Las comparaciones de OTUs, estimando la riqueza mediante el Índice Chao1, revelaron una cobertura de 73 a 90% para hongos y de 67 a 76% para procariotas, con un valor de 97% de identidad. En la Figura III.3 se muestra la comparación entre OTUs obtenida s (S) y estimadas por Chao1, para cada muestra.

Para analizar cambios en la estructura del microbioma rizosférico que pudieran asociarse al año de vendimia, se calcularon los valores de Riqueza (S), H y 1-D, por año. La Figura III.4 muestra los valores de Riqueza y de Índice de Shannon de las comunidades microbianas/año. El número de OTUs exhibió fluctuaciones en los tres años de estudio, tanto en las comunidades fúngicas (ANOVA, $F=7,724$, $p<0,001897$) como en las de procariotas (ANOVA, $F=5,781$, $p<0, 008374$).

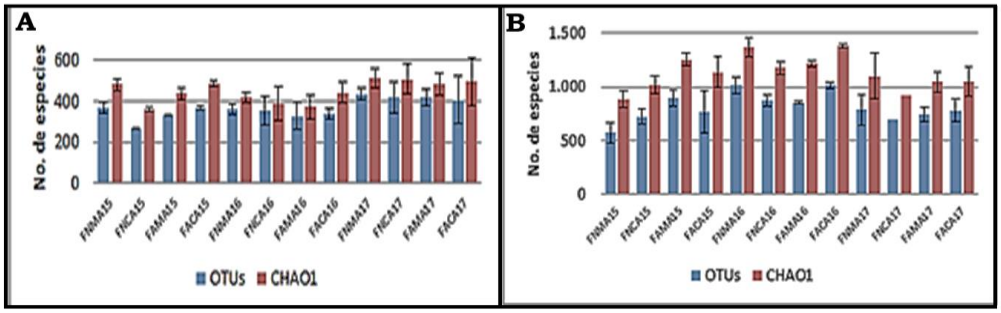

Figura III. 3. Comparación entre Riqueza (S) e Índice Chao1 para cada muestra. A: comunidad fúngica (ITS1); B: comunidad procariota (V3-V4 16S rRNA).

En la comunidad fúngica, el valor mayor de OTUs se observó en 2017, en tanto que en procariotas correspondió a 2016. La comparación entre años mediante el test *Tukey Pairwise* mostró una diferencia significativa en los valores de Riqueza de la comunidad fúngica entre 2015 y 2017 ($p<0,01054$) y entre 2016 y 2017 ($p<0,003157$), no detectándose diferencias entre 2015 y 2016 (Figura III.4A).

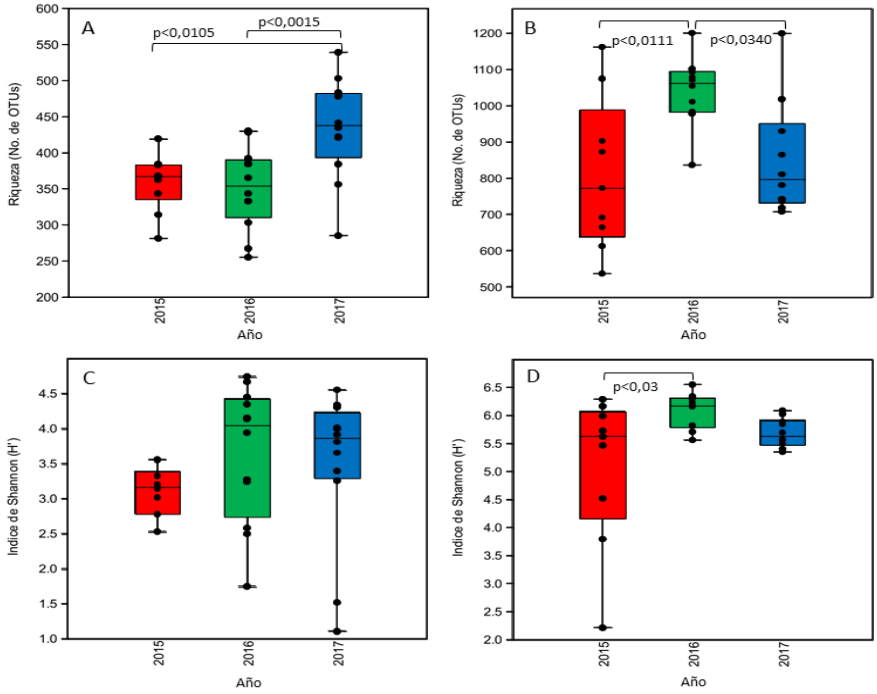

Figura III. 4. Boxplot de valores de Riqueza e Índice de Shannon por año. Ambos análisis se realizaron de modo independiente. A y C: Riqueza e Índice de Shannon de comunidad fúngica. B y D: Riqueza e Índice de Shannon de comunidad procariota. Se indican las diferencias significativas entre vendimias, según el test *Tukey Pairwise*.

La aplicación del mismo test a la comunidad procariota mostró diferencias en los valores de Riqueza entre 2015 y 2016 ($p<0,01117$) y entre 2016 y 2017 ($p<0,03401$) (Figura III.4B). Por otra parte, la evaluación de la diversidad mediante

el Índice H', no mostró diferencias significativas entre vendimias para la comunidad fúngica (Figura III.4C), en tanto sí las detectó en la comunidad procariota, entre los tres años (ANOVA, F=3,734, p<0,03755) y entre 2015 y 2016 (*Tukey Pairwise Test,* p<0,03008) (Figura III.4D). El Índice de Simpson no mostró diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados en las tres vendimias (datos no mostrados).

Para una mejor estimación de la comunidad microbiana rizosférica se calculó la β-diversidad (diversidad entre muestras). Para esto se aplicó una métrica de distancia sobre los perfiles taxonómicos obtenidos en cada sitio, resultando en una matriz de distancia entre todas las muestras. Según la similitud de sus miembros, las distancias entre muestras pueden calcularse de diferente forma: los métodos más comunes son Bray-Curtis y distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas (Bray & Curtis, 1957; Lozupone et al., 2007). Bray-Curtis sólo considera la composición taxonómica compartida entre muestras. UniFrac contempla la distancia genética entre OTUs de cada muestra, respecto de OTUs de las demás muestras. UniFrac ponderado agrega información sobre la abundancia relativa de cada OTU, a cada distancia genética. Dado que UniFrac no ponderado es muy sensible a OTUs raras, en tanto el ponderado lo es a OTUs dominantes, Chen et al., (2012) propusieron una versión de equilibrio, denominada UniFrac generalizado, y demostraron que su empleo otorga mejor potencia que el uso de otras métricas. La visualización por NMDS de las distancias calculadas a través de UniFrac generalizado en los microbiomas estudiados, permitió distinguir a las comunidades fúngicas (Figura III.5A y B) y procariotas (Figura III.6A y B), por año y por finca, en tanto no se observaron diferencias entre varietales (Figura III.5C, Figura III.6C).

La significancia de la división en grupos se verificó mediante análisis estadístico aplicando PERMANOVA y utilizando matrices de distancia (vegan::adonis), para años de cosecha (ambos grupos microbianos con valor p<0,001), fincas (ambos con valor p<0,001) y varietal (hongos con valor p>0,226 y bacterias con valor p>0,729). En las Figuras III.5D y III.6D se presenta el análisis NMDS identificando las muestras por año, finca y varietal.

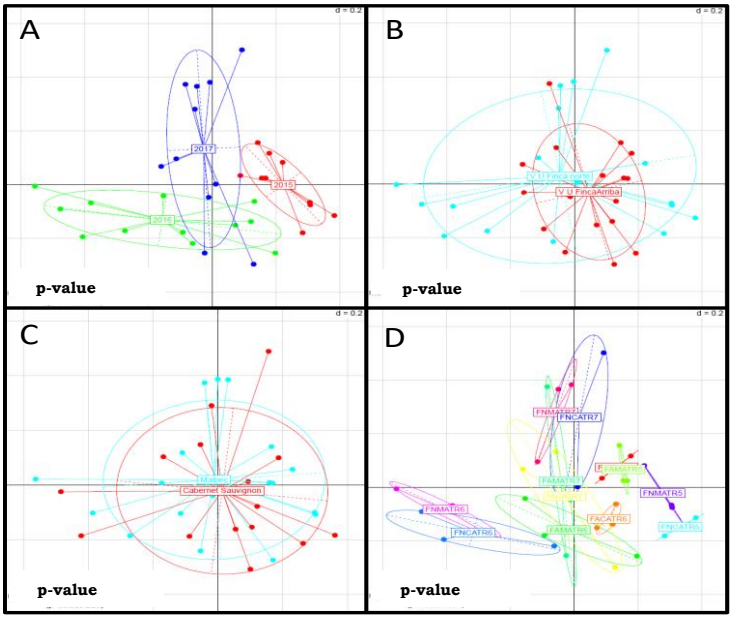

Figura III. 5. Análisis de Escalamiento Multidimensional no-métrico (NMDS) de comunidades eucariotas muestreadas en 2 fincas de San Juan, años 2015, 2016 y 2017. A: según año de muestreo; B: según finca de origen; C: según varietal; D: según muestra. El análisis se realizó aplicando UniFrac generalizado con distancias de disimilitud del 20%. Se indican los valores P de PERMANOVA. El centro de la elipse indica las medias de los grupos.

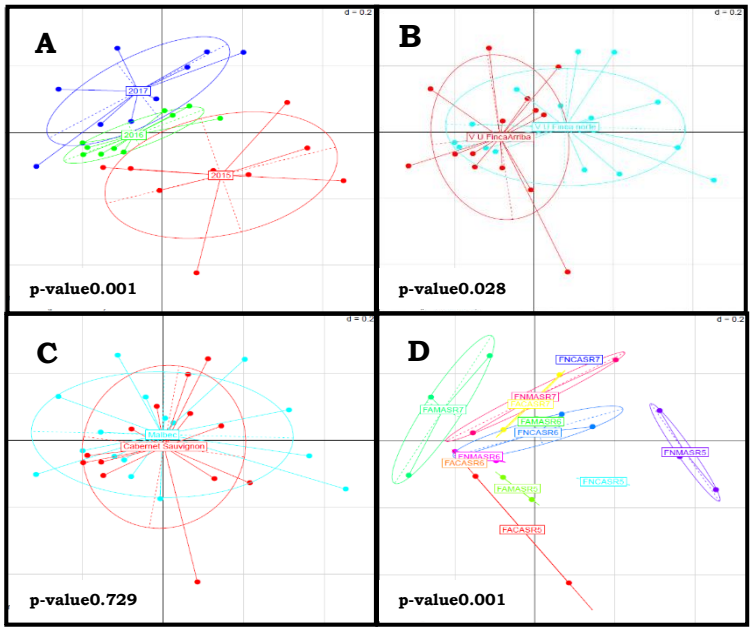

Figura III. 6. Análisis de Escalamiento Multidimensional no-métrico (NMDS) de comunidades procariotas muestreadas en 2 fincas de San Juan, años 2015, 2016 y 2017. A: según año de muestreo; B: según finca de origen; C: según varietal; D: según muestra. El análisis se realizó aplicando UniFrac generalizado con distancias de disimilitud del 20%. Se indican los valores P de PERMANOVA. El centro de la elipse indica las medias de los grupos.

III.3.4. Descripción de las comunidades microbianas

La composición taxonómica de las comunidades fúngicas en las muestras de rizósfera abarcó un total de 12 Filos (Phylum). El análisis de la composición de las comunidades fúngicas, por año de vendimia, mostró similitudes y diferencias, ya evidenciadas mediante el cálculo de índices de diversidad. Un 35% de las secuencias fúngicas no pudieron asignarse a ningún Filo (División) y representaron el 47% de la totalidad de OTUs en 2015. En 2016 y 2017, en cambio, su proporción disminuyó, con incremento de los *Ascomycota* (Figura III.7A).

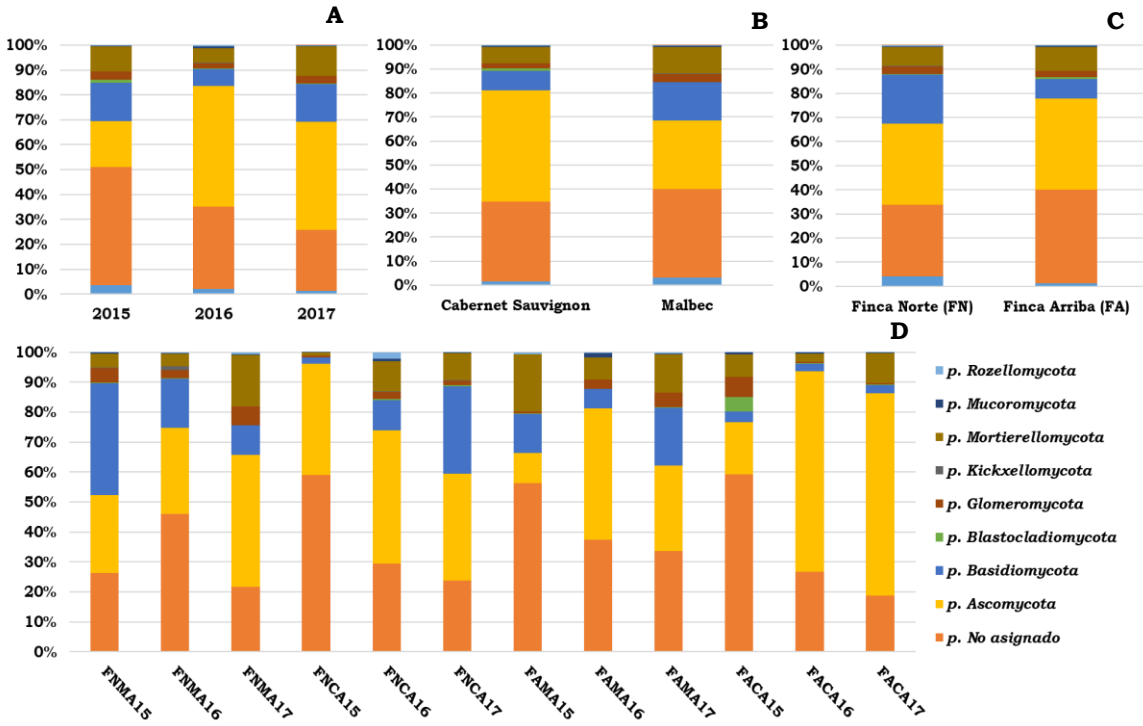

Figura III. 7. Promedio de abundancia relativa de los Filos Fúngicos dominantes en cada tipo de muestra. Se muestra por año de vendimia en A, por Finca en B, por Varietal en C y por muestra en D. Se presentan sólo los Filos con abundancia >0,1%.

Un análisis más detallado demostró que la elevada abundancia del clado *Dothideomycetes* (22%), se relaciona con una muy importante de hongos del orden *Pleosporales* (21%). Sus miembros mostraron un notable incremento entre 2015 (5%) y 2016 (36,8%) y constituyen el grupo que explica el aumento de los *Ascomycota* en dicho período. Su abundancia relativa resultó mayor en el varietal Cabernet Sauvignon (29,8%) y en Finca Arriba (24%), mientras que en Malbec y Finca Norte los valores resultaron 15% y 13,6%, respectivamente. Los *Ascomycota* dominantes incluyeron miembros de los géneros *Fusarium, Lophiostoma, Metarhizium* y *Mycoarthris* (abundancia relativa >0,5%). Otros órdenes con representación en las

comunidades, pero en menores valores, resultaron ser: *Hypocreales* (7%), *Agaricales* (7%) y *Helotiales* (2.1%), del grupo *Ascomycota*; *Mortierellales* (9%), del grupo *Mortierellomycota*, y *Glomerales* (1.9%), del grupo *Glomeromycota*.

Con la intención de determinar la existencia de grupo/s taxonómico/s específicos de año, finca o varietal, se compararon la OTUs identificadas a nivel de género. Los datos revelaron que, de los 206 géneros identificados, sólo 102 estuvieron presentes los tres años (Figura III.8A). La comparación por finca y varietal indicó la presencia de 151 y 160 géneros en común, respectivamente (Figura III.8B y 8C).

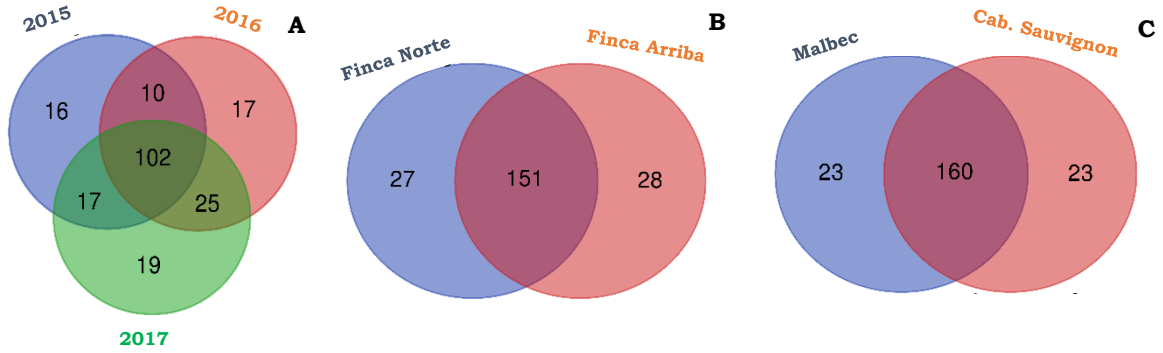

Figura III. 8. Diagrama de Venn señalando géneros fúngicos compartidos. A: por año; B: por finca y C: por varietal. Las áreas superpuestas indican número de OTUs compartidos.

Debe considerarse que este análisis sólo da cuenta de presencia/ausencia y no indica proporciones de cada uno en la muestra. En las comparaciones por vendimia y finca, sólo en 2015 y en Finca Norte el porcentaje de géneros exclusivos superó el 1%. Los géneros diferenciales en estas muestras coincidieron y correspondieron a *Coprinus* (6,5%) y T*richoglosum* (1%). Cuando se realizó la comparación de varietales, los géneros exclusivos no superaron el 0,1% de la comunidad microbiana.

La comunidad procariota asociada a la rizósfera de la vid estuvo compuesta por los filos bacterianos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria*, además de las arqueas *Thaumarchaeota*, independientemente del año, finca y cultivar (Figura III.9). Entre los filos menos abundantes, *Chloroflexi, Verrucomicrobia, Parcubacteria, Candidate división WPS-1, Candidatus_Saccharibacteria, Nitrospirae* se hallaron en todas las muestras.

En cambio, *Armatimonadetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Tenericutes, Latescibacteria* y *Parcubacteria* sólo estuvieron presentes en algunos sitios. Las clases bacterianas identificadas como más abundantes constituyeron el 75% de las OTUs y correspondieron a

Alphaproteobacteria (25%), *Nitrososphaerales* (10,9%), *Gammaproteobacteria* (10,9%), *Cytophagia* (8,1%), *Actinobacteria* (7,7%), *Bacilli* (7,1%) y *Sphingobacteria* (6,3%). En cuanto a las arqueas, casi la totalidad correspondió a al género de *Nitrososphaera*.

La caracterización de cambios en la comunidad procariota, dependientes del año de vendimia, permitió observar un marcado descenso de las *Proteobacterias* (55% en 2015 a 36% en 2016) y en los *Firmicutes* (13,3% en 2015 a 5,3% en 2016). Este descenso no correlaciona con incremento en algún filo particular sino, como se observa en la Figura III.9A, con un aumento del resto de los filos.

Las arqueas mostraron, como cambio principal, una modificación del porcentaje de presencia: de 3% en 2015 a 15% en 2016. Entre 2016 y 2017 se observaron como cambios más evidentes los correspondientes a *Bacteroidetes* (11,8% en 2016 y 17,3% en 2017) y a *Firmicutes* (5,3% en 2016 y 7,9% en 2017) (Figura III.9A).

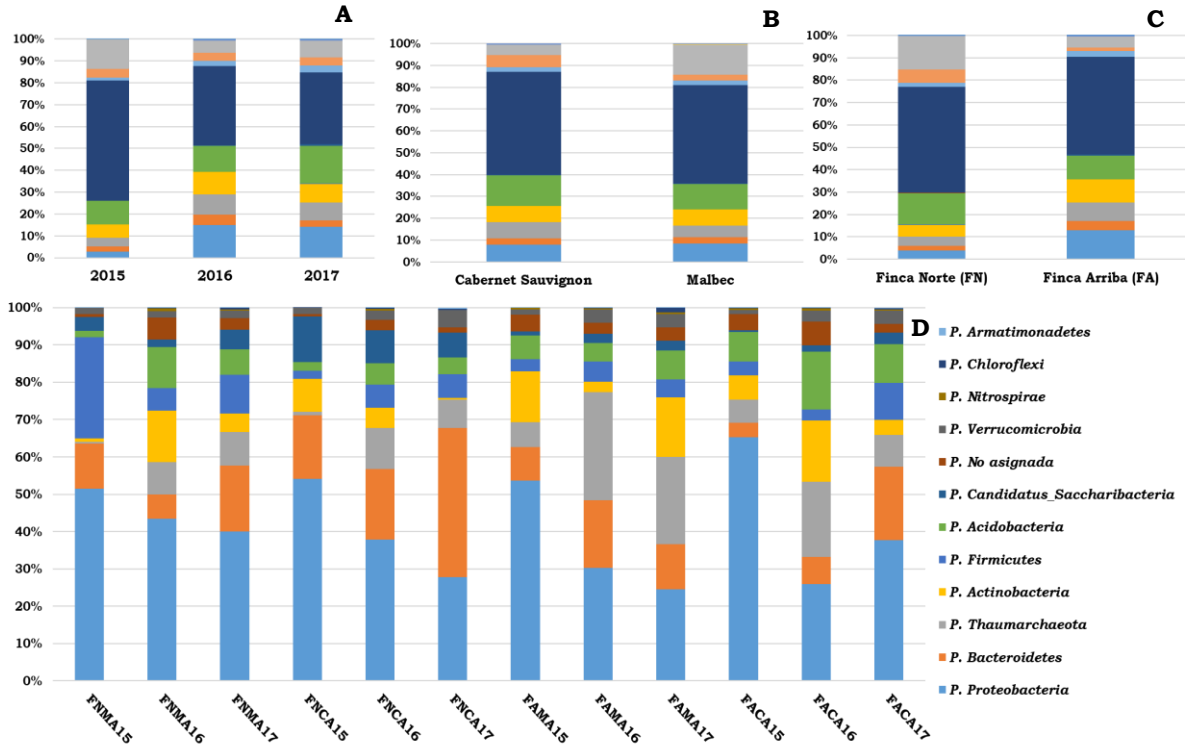

Figura III. 9. Abundancia relativa promedio de filos procariotas dominantes en cada muestra. A: por año de vendimia; B: por finca; C: por varietal y D: por sitio de muestreo. Sólo se grafican los filos con abundancia >0,1%.

El análisis de disminución de las *Proteobacteria* según año de estudio mostró que el cambio se debió, principalmente, al descenso de *Rhodospirillales*,

pertenecientes a *a-proteobacterias*, y de *Enterobacteriales Pseudomonadales*, pertenecientes a *γ- proteobacterias* (Figura III.10).

Respecto a la composición de los filos bacterianos presentes en las fincas analizadas (Figura III.9C), en FN se detectó mayor proporción de *Firmicutes* (15% en FN y 5% en FA), reflejándose una distribución más equilibrada de otras poblaciones como, *Bacteroidetes* (14% en FN y 11% en FA). También se detectaron diferencias en otras taxa menos abundantes en FA como, *Actinobacterias* (5% en FN y 10% en FA), *Acidobacterias* (4% en FN y 8% en FA), y en las arqueas *Thaumarchaeota* (4% en FN y 13% en FA) (Figura III.9C).

También se observó que la presencia de *Firmicutes* resultó 3 veces superior en Finca Norte (15% FN, 4,8% FA). Por el contrario, los filos *Thaumarchaeota* (4% FN, 13% FA), *Acidobacteria* (4,2% FN, 8,3% FA) y *Actinobacteria* (5,2% FN, 10,4% FA) se hallaron más representados en Finca Arriba (Figura III.9C).

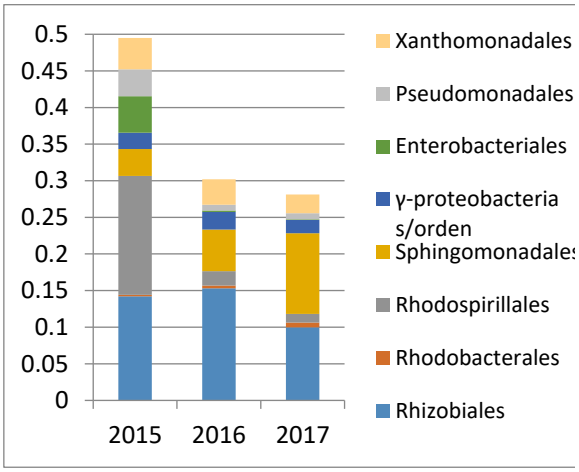

Figura III.10. Promedio de abundancia relativa de *Proteobacterias* según año de muestreo. Sólo se grafican los órdenes con abundancia >1%.

La variación en la distribución poblacional según varietal reveló que *Firmicutes* se encontró en menor abundancia en Cabernet Sauvignon (5%) que en Malbec (14%). El filo *Candidatus Saccharibacteria* mostró un comportamiento inverso, mayor abundancia en la rizósfera de Cabernet Sauvignon (5,2%) que en Malbec (2,85%) (Figura III.9B).

Las comunidades procariotas se compararon por año, finca y varietal, con el propósito de observar la existencia de grupo/s taxonómico/s específicos de OTUs identificadas a nivel de género. Los datos revelaron que, de los 214 géneros identificados, 148 estuvieron presentes en los tres años (Figura III.11A). La comparación por finca y varietal mostró que las OTUs comunes son 177 y 182, respectivamente (Figura III.11B y 11C). En las tres comparaciones, el porcentaje de OTUs exclusivas no superó el 0,3% de la abundancia relativa de cada grupo.

Resulta de interés evaluar cuáles son las variables que podrían modular el microbioma de un cierto ambiente. El Análisis Canónico de Correspondencias (CCA, del inglés *Canonical Correspondence Analysis*) se desarrolló para relacionar la abundancia de especies con variables ambientales (Ter Braak, 1986).

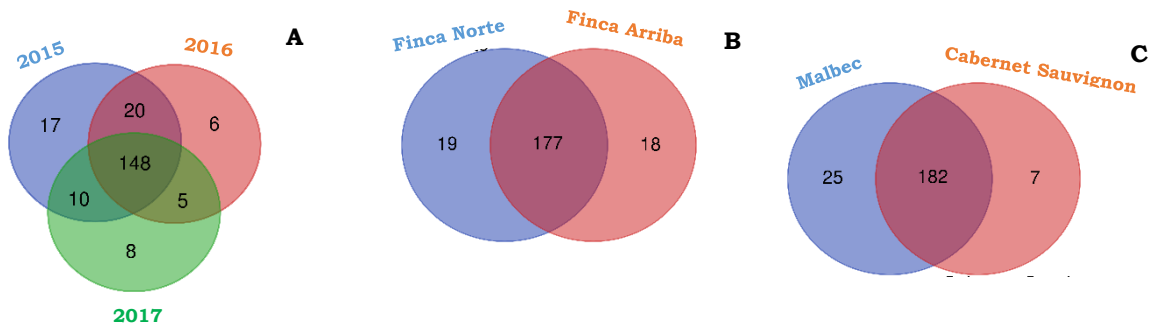

Figura III. 11. Diagrama de Venn que indica número de OTUs procariotas compartidas (áreas superpuestas). A: por año; B: por finca y C: por varietal.

En las Figura III.12 y Figura III.13 se muestran los análisis CCA realizados con los datos de las comunidades fúngica y procariota de rizósfera de vid, respectivamente. El CAA mostró 62,07% de variabilidad total en los primeros dos ejes, para las comunidades fúngicas el 64,55% de variabilidad total en las comunidades procariotas. Nuevamente, se observa una separación de las muestras según año de análisis. La posición de FAMA15 y de FACA15 se ve muy influenciada por el contenido de fósforo asimilable. Lo mismo puede observarse para *β- γ- ε-Proteobacterias*, un grupo no asignado a ninguna clase de *Firmicutes*, y para *Acidobacteria Gp7*. La mayoría de los procariotas se ubican en la zona con mayor contenido de materia orgánica, nitrógeno y carbono y en las regiones con menor pH.

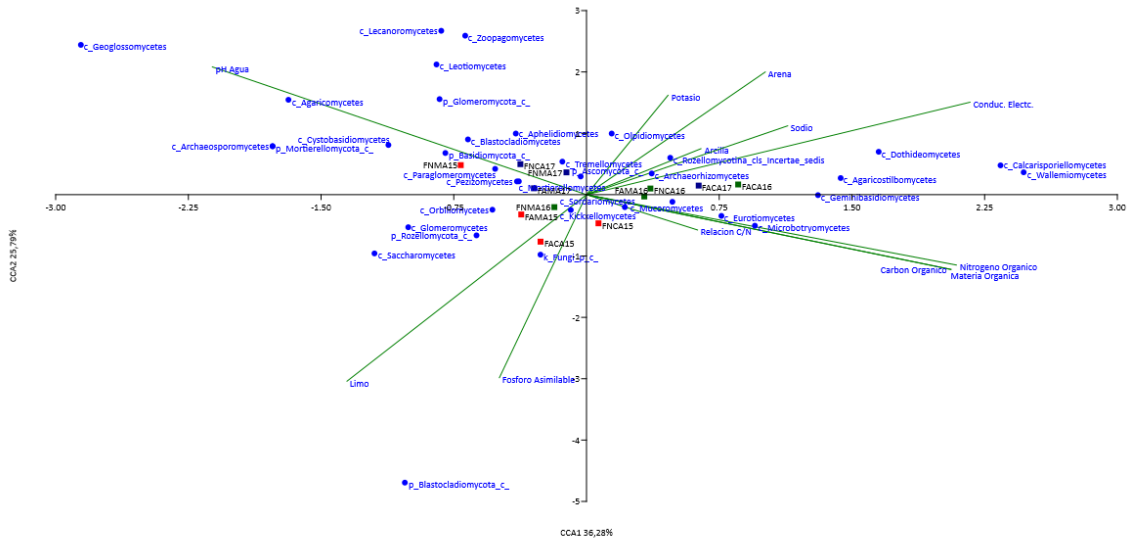

Figura III.12. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) de la comunidad fúngica.

En cuanto a la distribución de las comunidades fúngicas, un grupo se ubica en las zonas donde aumenta la materia orgánica, el carbono, el nitrógeno y existe

una mayor abundancia de arena y arcilla (*Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Agaricostilbomycetes*, *Calcarisporiellomycetes*, *Geminibasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Wallemiomycetes*). Los *Saccharomycetes*, *Glomeromycetes*, *Rozellomycotina* y una clase no asignada del grupo *Blastocladiomicetos* se asocian al contenido de fósforo asimilable y al limo. En cambio, *Geoglossomycetes*, *Agaricomycetes* y aquellos hongos no asignados a ninguna clase y pertenecientes al filo *Basidiomycota* y *Mortierellomycota*, se asocian a suelos con mayor pH.

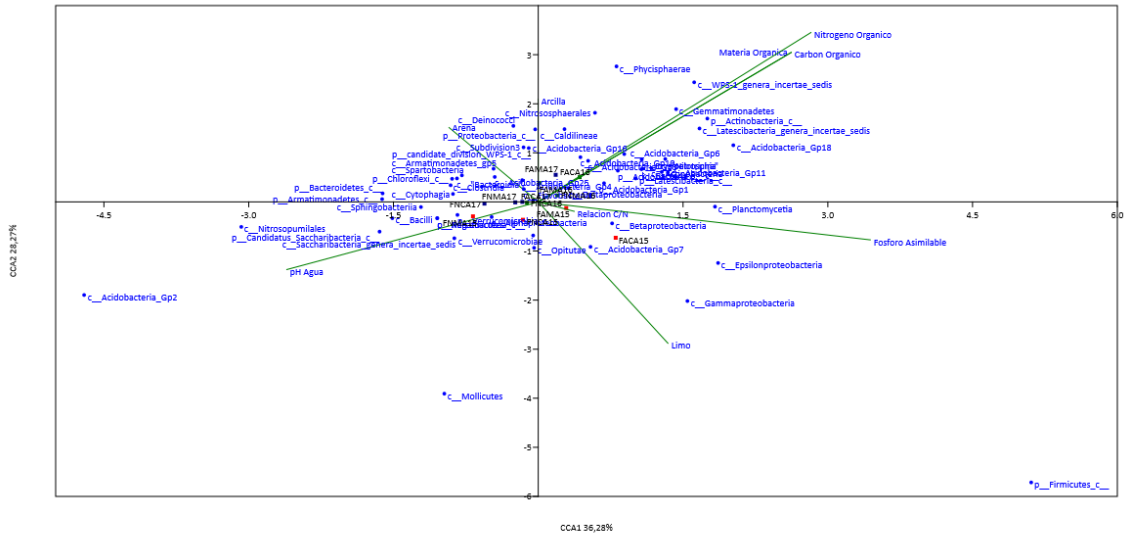

Figura III.13. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) de la comunidad procariota.

III.4. Discusión

Se postula que el suelo de un viñedo representa el reservorio principal de los microorganismos asociados a las vides (Burns et al., 2015; Bokulich et al., 2016; Belda et al., 2017), que en su mayoría se relacionan con procesos de nutrición y desarrollo de las plantas y con la calidad de las uvas y el vino. A su vez, las plantas (distintos genotipos), las características del suelo y las prácticas agrícolas son determinantes importantes de la estructura de la comunidad microbiana presente en la rizósfera (Wu et al., 2008; Turner et al., 2013; Tkacz et al., 2015). En este estudio se determinaron las comunidades microbianas propias de la rizósfera de dos varietales de vid cultivadas en una misma zona, con el propósito de explorar las relaciones entre los distintos factores que influyen en la estructura de la misma. Los resultados alcanzados mostraron que el año de cosecha y el viñedo emergieron como los factores principales en la determinación de la composición de las comunidades

microbianas, para ambos varietales analizados. Zarraonaindia et al., (2015) caracterizaron, en dos cosechas sucesivas, la dinámica espacial y temporal de comunidades bacterianas asociadas con los órganos de la vid (hojas, flores, uvas y raíces) (varietal Merlot) y suelos, para determinar la influencia del cultivar, los parámetros edáficos, el estadio de desarrollo de la vid (dormancia, floración, pre-cosecha) y el viñedo (5 viñedos de Long Island, Suffolk Count, NY, USA). En dicho trabajo demostraron que el suelo (rizósfera y suelo) constituye el factor principal en la definición de la composición y estructura del microbioma, siendo los factores edáficos y el manejo del viñedo los determinantes secundarios.

La caracterización fisicoquímica de los suelos mostró, en este trabajo, algunas diferencias entre los viñedos estudiados. Las principales se relacionaron con el mayor contenido de fósforo asimilable, materia orgánica, carbono y nitrógeno orgánicos y menor pH observados en Finca Arriba respecto de Finca Norte. De acuerdo al análisis de CCA, estas variables resultaron involucradas en la distribución de taxa en las comunidades microbianas. Considerando el varietal, Malbec o Cabernet Sauvignon, la variación resultó no significativa.

Con respecto a la distribución de taxa, se halló que los filos dominantes en Bacteria resultaron ser: *Proteobacteria* (41%), *Bacteroidetes* (15%), *Actinobacteria* (7,8%), *Firmicutes* (7,4%) y *Acidobacteria* (7%). Esta distribución resulta parcialmente concordante con trabajos publicados por otros autores (Vega-Avila et al., 2014; Zarraonaindia et al., 2015; Novello et al., 2017). En el análisis de muestras de rizósfera, Zarraonaindia et al., (2015) observaron un predominio de secuencias atribuidas a *Proteobacteria* (57%), *Acidobacteria spp.* (10%), *Bacteroidetes spp.* (13%), *Verrucomicrobia* (5%) y *Actinobacteria* (5,1%). Novello et al., (2017) hallaron, como filos predominantes en un viñedo Pinot noir de Piamonte (Italia): *Actinobacteria* (50%), *Proteobacteria* (35%), *Gemmatimonadetes* (3.5%) y *Bacteroidetes* (3,5%). Vega-Avila et al., (2014), analizaron la diversidad de microorganismos asociados al varietal Syrah, y mostraron como filos más abundantes a *Proteobacteria* (29%), *Actinobacteria* (9,7%), *Firmicutes* (7,2%), *Bacteroidetes* (6,9%), *Acidobacteria spp.* (4,5%) y *Verrucomicrobia* (2,7%). En la mayoría de estos trabajos existe concordancia respecto a la proporción de *Proteobacterias*; sin embargo, se detectan diferencias en la abundancia del resto de los filos. La relación entre *Proteobacterias* y *Acidobacterias*, en comunidades bacterianas rizosféricas, mostró ser un indicador del contenido de nutrientes del suelo, ya que las *Proteobacterias* se vinculan a suelos ricos en nutrientes y las *Acidobacterias* a suelos pobres (Beckers et al., 2017).

En este trabajo, la mayor abundancia dentro de *Proteobacterias*, correspondió a *Rhizobiales* (13,7%), grupo bien conocido por contribuir a la nutrición de plantas leguminosas a través de la fijación biológica de nitrógeno. Recientemente se han descripto especies que promueven el crecimiento en plantas no leguminosas (Bacon & White, 2015; Zhang et al., 2015). Adicionalmente, el marcador V3-V4 *16S rRNA* permitió identificar al grupo de arqueas *Thaumarchaeota* (10%). Este grupo estuvo casi totalmente compuesto por *Nitrososphaera spp.*, con capacidad de oxidar amonio, razón por la cual podría desempeñar un papel importante en la nitrificación del suelo (Tourna et al., 2011).

Respecto a las comunidades fúngicas, los filos mayoritarios identificados resultaron ser: *Ascomicetos* (36%), *Basidiomicetos* (13%) y *Mortierellomicetos* (8,7%), junto a un grupo no clasificado en ningún filo (35%). Estos resultados concuerdan con lo descripto por Deacon et al., (2006), quienes observaron que los *Ascomicetos* predominan en suelos agrícolas mientras los *Basidiomicetos* predominan en pastizales. Pese a las importantes funciones que desempeñan los hongos en mantener la sanidad del suelo, los estudios de diversidad asociada a las vides se han centrado en la parte aérea de las plantas (Setati et al., 2012; Pinto et al., 2014; Taylor et al., 2014; Setati et al., 2015; Singh et al., 2018). Los hongos del suelo pueden clasificarse en grupos funcionales, que incluyen a: controladores biológicos, reguladores del ecosistema y especies que participan en descomposición de la materia orgánica y transformaciones compuestas (Frac et al., 2018). Los *Ascomicetes* desarrollan una función central en la mayoría de los ecosistemas terrestres por intervenir en la descomposición de materiales orgánicos, como hojas muertas, tallos, árboles caídos, y resultan clave en suelos agrícolas (Frac et al., 2018). Además, se ha reportado que la abundancia de *Ascomicetos* se relaciona con la fertilización nitrogenada (Zifcakova et al., 2016).

Para el desarrollo de la agricultura también resulta de importancia la asociación de hongos micorrícicos arbusculares con plantas. Estos hongos facilitan la absorción de los nutrientes minerales del suelo, a cambio del carbono asimilado por las plantas (Smith & Read, 2008). En el presente estudio se identificaron secuencias correspondientes a hongos micorrícicos arbusculares, en su mayoría *Glomerales* (2%). Sólo en unos pocos casos se pudo identificar el género, dado el bajo nivel discriminatorio de la secuencia evaluada. Estudios realizados en distintas regiones vitivinícolas sugieren que la diversidad de hongos micorricicos resulta influenciada principalmente por el tipo de suelo, más que por las características de

la planta hospedadora o las prácticas agrícolas (Schreiner & Mihara, 2009; Balestrini et al., 2010; Likar et al., 2013).

Los resultados alcanzados en este trabajo reafirman el impacto de ciertos parámetros fisicoquímicos del suelo en la estructura de las comunidades microbianas asociadas a la vid, independientemente de la zona o varietal cultivado. Se evidenció también que las variaciones del pH y del contenido de nutrientes resultan factores clave, capaces de alterar significativamente y en un corto período de tiempo, la composición de las microbiotas fúngica y bacteriana, en un mismo sitio. Estos resultados abren la posibilidad de poder modificar el patrón de distribución de microorganismos con el propósito de mantener la sustentabilidad de los suelos, a través de distintas prácticas agrícolas.

III.5. Material Suplementario

Tabla III.S1. *Resumen de datos obtenidos del procesamiento de resultados de secuenciación ITS1 y V3-V4 16S rRNA.* Se observa que el número de amplicones varía entre ITS1 y *16S rRNA*, y explica el diferente número de lecturas de calidad seleccionadas para ambos tipos de datos, obteniéndose un número importante de OTUs tanto para comunidades fúngicas (2.863) como para bacterianas (2.810).

	ITS1	***16S rRNA***
Nº total de muestras	36	36
Nº total de muestras amplificadas	34	29
Nº total de amplicones	2.751.340	537.607
Máximo	212.851	64.257
Mínimo	19.107	5.924
Media	82.409.5	13.425
Mean	80.921,8	18.538,2
Lecturas de calidad seleccionadas	19.000	5.000
Nº total de OTUs	2.863	2.810

Capítulo IV. Caracterización de Propiedades Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en bacterias aisladas de rizósfera de vides originarias de diferentes regiones vitivinícolas de Argentina

VI.1. Introducción

La vid es uno de los frutales más cultivados en el mundo; se trata de una planta perenne con alrededor de 24,000 especies descriptas, siendo *Vitis vinífera L.* la única empleada para elaboración de vino (Dry & Gregory, 1988). Se estima que el 66% de la producción mundial de uva se destina a la obtención de vinos y mostos (Anderson et al., 2003). Sin embargo, y como consecuencia del cambio climático, se ha registrado una reducción de la superficie cultivada con viñedos, así como una mayor exposición de las plantas a la acción de patógenos que las afectan durante todo su ciclo vegetativo (brotación, foliación, floración, fructificación, envero y maduración) (Wang et al., 2017; Sugiura et al., 2017; Zyprian et al., 2018), razón por la cual se realizan múltiples esfuerzos destinados a proteger este cultivo durante todo su ciclo biológico. Una estrategia simple ha sido la aplicación de fungicidas y fertilizantes químicos, con los consiguientes problemas de contaminación ambiental, sumados a la inducción de mutaciones en los fitopatógenos por acción de los fungicidas químicos, que pueden resultar en el desarrollo de resistencia a los mismos (Brent, 2011; Sierotzki & Scalliet, 2013; Mair et al., 2016). Asimismo, el uso de fertilizantes conlleva un riesgo elevado de daños ambientales, como la contaminación de aguas subterráneas y del suelo sobre el que se aplican. Por esto, tanto los vitivinicultores como la comunidad científica buscan alternativas para el manejo de plagas y la preservación de la fertilidad de los suelos en los viñedos, consistiendo una de ellas en la aplicación de microorganismos como sustituto de los productos químicos.

Los microorganismos establecen con las plantas asociaciones complejas y dinámicas que van desde las mutuamente beneficiosas hasta el comensalismo o las patogénicas (Kogel et al., 2006; Newton et al., 2010). Estas asociaciones planta-microorganismo ejercen un papel clave en la calidad del suelo, la productividad y sanidad de la planta, a través de mecanismos directos o indirectos, tales como mineralización de la materia orgánica del suelo, activación de mecanismos de defensa de las plantas, y producción de antibióticos contra fitopatógenos (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Compant et al., 2010; Bhattacharyya & Jha, 2012; Bacon & White, 2015; Rashid et al., 2015).

Al grupo de bacterias que desarrollan relaciones beneficiosas con las plantas se lo conoce como *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal* (PGPR por su nombre en inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Las PGPR pueden colonizar tanto la superficie (epífitas) como el interior de las plantas (endófitas). El uso de PGPR

conduce al sustento de una adecuada nutrición vegetal y a la reducción de los efectos ambientales negativos de los fertilizantes químicos. La rizósfera es el origen más probable de muchos de estos organismos.

Se consideran mecanismos de acción directos de las PGPR a aquéllos involucrados en el crecimiento vegetal, encargados de poner a disposición de las raíces varios de los nutrientes presentes en el suelo que, en muchos casos, no pueden ser solubilizados por las plantas. Los más destacados son: i) la fijación biológica de nitrógeno, ii) la solubilización de fósforo y iii- la producción de hormonas vegetales (fitohormonas como auxinas, giberelinas, citoquininas, etc.) responsables de la estimulación de crecimiento.

Por otra parte, los mecanismos indirectos se refieren a aquéllos involucrados en reducir la incidencia de enfermedades, controlando el desarrollo de fitopatógenos. Se conocen como control biológico y pueden ocurrir a través de la síntesis de metabolitos tales como sideróforos, quitinasas y/o antibióticos, o a través de la Inducción de Resistencia Sistémica (ISR) en la planta. Mediante ISR las rizobacterias pueden inducir actividad biológica o química en la planta hospedadora, que le otorga protección contra patógenos (Couillerot et al., 2009; Vacheron et al., 2013). La inhibición de fitopatógenos incluye, además, la competencia por espacio y enzimas líticas (Tariq et al., 2017), siendo las quitinasas, glucanasas y proteasas las principales enzimas hidrolíticas de la pared fúngica.

En el caso particular de las vides, numerosas investigaciones se han orientado a la caracterización del posible empleo de distintos PGPR (Ait Barka, Nowak, & Clement, 2006; Sabir et al., 2012; Bartolini et al., 2017; Daler & Cetin, 2017). Por ejemplo, Sabir et al., (2012) estudiaron los efectos de la inoculación de cepas como *Burkholderia gladii* BA-7, *Bacillus subtilis* OSU-142, *Bacillus megaterium* M-3 y *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el desarrollo vegetativo y la captación de minerales por porta-injertos de vid. Encontraron que la inoculación bacteriana promovía el desarrollo vegetativo de los porta-injertos, siendo *A. brasilense* Sp245 la cepa más eficiente. *B. subtilis* OSU-142OSU-142 también estimuló significativamente el desarrollo vegetativo y la adquisición de minerales por las plantas. En otro estudio, la cepa *A. brasilense* Sp245 mostró potencial para promover el crecimiento radicular de porta-injertos de vid en viveros y en vides jóvenes (Bartolini et al., 2017). Otras investigaciones demostraron que la inoculación con PGPR puede incrementar la biomasa foliar, la longitud del sarmiento y la actividad fotosintética cuando la planta se encuentra bajo situaciones de estrés (Rolli et al., 2015, 2016).

Recientemente, Aziz et al., (2015) analizaron la relación entre la efectividad de inoculaciones únicas y binarias de bacterias seleccionadas para inducir ISR contra *Botrytis cinérea*. Los resultados revelaron la eficacia de *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 sola o en combinación con *Pantoea agglomerans* PTA-AF2 o con *Bacillus subtilis* PTA-271, para desencadenar la resistencia de la vid contra *B. cinérea*, sin comprometer el rendimiento de la planta.

En relación a las PGPR se sabe que los microorganismos de la rizósfera de una planta específica pueden adaptarse mejor a esa planta y su entorno y, por lo tanto, pueden proporcionar un mejor control de las enfermedades que organismos procedentes de otras rizósferas (Cook, 1993). En Argentina, Salomon et al., (2013) analizaron el efecto de la inoculación con PGPR aisladas de vides en Tupungato, Mendoza, para estudiar los mecanismos involucrados en la relación planta-PGPR. Sus resultados sugieren que cepas de *Bacillus licheniformis* y *P. fluorescens* actúan como moderadoras del estrés hídrico al inducir la síntesis de ABA (ácido abscísico), que disminuye la pérdida de agua en la planta.

La industria vitivinícola enfrenta el desafío de mantener una elevada productividad, garantizando la sustentabilidad ambiental y logrando productos de calidad, inocuos para los consumidores, y sanitariamente seguros para los trabajadores del sector. En este contexto, resulta importante la generación y difusión de técnicas y bioinsumos formulados a base de PGPR que favorezcan la producción, reduciendo el impacto ambiental que ocasionan los productos de síntesis química. Por ello, el presente trabajo propone generar una colección de aislamientos provenientes de rizósfera de vides originarias de distintas regiones vitivinícolas de Argentina y caracterizar sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

VI.2. Materiales y métodos

VI.2.1. Toma de muestras rizosféricas de vid y aislamiento de bacterias

Las muestras de suelo rizosférico se tomaron de plantas de *V. vinífera* cv. Malbec y Cabernet Sauvignon hasta siete días previos a la cosecha, en 11 parcelas ubicadas en tres regiones vitivinícolas de Argentina: Cuyo, Noroeste y Patagonia. En la Tabla IV.1 se detalla la procedencia, denominación y geolocalización de cada parcela muestreada. Las muestras de rizósfera se tomaron a partir de raíces y se recolectaron a 10-30 cm de profundidad, con pala desinfectada y a 20 a 30 cm del tallo hacia el interior de la entrefila. Se mantuvieron refrigeradas a 4°C, en bolsas estériles, hasta su procesamiento.

Tabla IV. 1. Sitios de muestreo para la obtención de la colección de aislamientos.

Región	Provincia	Sitio	Varietal	Ubicación	msnm	Nombre	No. de aislamientos
Patagonia	Rio Negro	Mainqué	Malbec	S 39° 02.190' w067° 19.757'	600	NMr	15
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	S 33° 09.437' w068° 53.700	930	Tms	19
		Agrelo	Cabernet Sauvignon	S 33° 09.416' w068° 53.657	920	Tct	10
	San Juan	Finca Norte	Malbec	S 31° 27.114' w068° 42.523'	780	Nmp	7
		Finca Norte	Cabernet Sauvignon	S 31° 27.002' w068° 42.109'	770	Ncqc	19
		Finca Arriba	Malbec	S 31° 28.407' w068° 45.486'	800	Fam	14
		Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	S 31° 28.407' w068° 45.347'	800	FACn	22
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	S 26° 04.846' w066° 00.022'	1700	Fau	21
		Molinos	Cabernet Sauvignon	S 26° 04.815' w066° 00.206'	1700	AMCv	13
		Cachi	Malbec	S 25° 30.495' w066° 23.360'	2200	Cmw	16
		Finca Arenal	Malbec	S 25° 02.669' w066° 04.460'	2600	Aex	13

Para el aislamiento de bacterias se aplicó la siguiente metodología: el material tratado asépticamente se homogeneizó, individualmente, en un volumen definido de solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v) y se sembraron diluciones 1:10, 1:20 y 1:50 en placas de agar LB (Miller, 1971) adicionado con cicloheximida para evitar el crecimiento de hongos. Las bacterias aisladas y purificadas se seleccionaron en base a características fenotípicas (morfología de la colonia, color, movilidad, velocidad de crecimiento).

De cada viñedo, se seleccionaron alrededor de 20 colonias que se purificaron mediante estrías en placas de LB. Se verificó la pureza de cada aislamiento seleccionado y los mismos se conservaron en caldo LB adicionado de 50% v/v glicerol, mantenido en freezer de -20 °C hasta su caracterización. La identificación se realizó mediante Espectroscopía de Masa MALDI TOF de proteínas totales, usando

el programa MALDI Biotyper (Bruker), disponible en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos (Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA, CONICET).

IV.2.2. Identificación de aislamientos bacterianos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF

La identificación de aislamientos bacterianos se realizó mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight-Mass Spectrometer*), empleando el *software* MALDI Biotyper 3.1 (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) (Maier et al. 2006). La preparación de las muestras se efectuó según el método de extracción de proteínas por lisis celular descripto por Bruker Daltonics. Brevemente, colonias bacterianas de 24-48 h de crecimiento en caldo se resuspendieron en etanol 80%, se centrifugaron a 10.000 rpm por 2 min y finalmente en 20 µl de ácido fórmico 70%: acetonitrilo 100% (1:1).

Para el análisis, 1 µl de suspensión celular se sembró en cada spot de una placa MALDI TOF, que luego se recubrió con 1 µL de solución saturada de matriz (10 mg/mL de ácido α-ciano-4 hidroxicinámico en solución orgánica (50% acetonitrilo + 2,5% TFA).

Los espectros de masas se obtuvieron manualmente, en un rango de 2 a 20 kDa, en modo lineal positivo, utilizando el *software* Flex Control (3.3) acoplado a un espectrómetro de masas modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics). Se utilizó el calibrante BTS (Bacterial Test Standard) (Bruker Daltonics), consistente en proteínas ribosomales de la cepa *E. coli* DH5α más las proteínas RNAsa A y mioglobina, con masas moleculares correspondientes a 13.683 y 16.954 Da, respectivamente. La identificación a nivel de género o de especie de los espectros obtenidos se realizó de acuerdo a los valores de puntuación (scores) del *software* MALDI Biotyper: > 2 identificación a nivel de especie, de 1,7 a 1,9 identificación a nivel de género y < 1,7 identificación no confiable.

IV.2.3. Ensayos in vitro de capacidades indicadoras de promoción de crecimiento vegetal por rizobacterias

Los aislamientos seleccionados de la rizósfera se evaluaron *in vitro* mediante ensayos estándar para identificar actividades relacionadas a la promoción de crecimiento vegetal. Se evaluó la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, celulasas, amilasas, pectinasas y proteasas. Cada prueba se realizó por triplicado. Para la solubilización de compuestos insolubles de fósforo se utilizó el

medio sólido NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium*, Nautiyal, 1999), con glucosa como fuente de carbono y energía. La producción de sideróforos se detectó mediante la formación de un halo naranja alrededor de la colonia bacteriana, en medio agar Cromo Azurol S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987), por el método de la bicapa (Pérez-miranda et al., 2007). La producción de amilasas se determinó en placa según lo descripto por Lopez et al. (2018). La producción de proteasas se analizó según Brown & Foster (1970), la de celulasas según Hankin & Anagnostakis (1977).y la de pectinasas según Soares et al. (1999).

V.2.4. Ensayos de biocontrol in vitro contra hongos fitopatógenos

Se probó la actividad antagonista contra los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata, Botritys cinerea, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Penicillium expansum* y *Penicillium oxalicum* mediante un ensayo de doble cultivo en medio patata-dextrosa-agar, a temperatura ambiente, aplicando un protocolo modificado basado en Whipps (1987). El procedimiento seguido consistió en sembrar los aislados bacterianos en un círculo de 2 cm de diámetro, en una placa de agar-dextrosa-papa (4 g de extracto de papa, 20 g de dextrosa, 15 g de agar en 1000 ml de agua destilada) y cultivarlos durante 24 h a 30 °C. En el centro del círculo se colocó un tapón de hongos y las placas se re-incubaron a 28 °C durante 6 días. La inhibición del crecimiento fúngico se consideró positiva cuando el crecimiento del micelio se inhibió alrededor de una colonia bacteriana determinada.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Diversidad de bacterias cultivables halladas en las diferentes muestras

A partir de las 11 muestras (7 de Malbec y 4 de Cabernet Sauvignon) recolectadas en las regiones vitivinícolas de Patagonia, Cuyo y Noroeste se realizó el aislamiento de las bacterias cultivables de la rizósfera, como se indicó en Materiales y Métodos. De las 15 a 25 colonias elegidas al azar, por cada sitio de muestreo, el 14% no sobrevivió en el subcultivo o durante la conservación en glicerol a -20 °C, obteniendo finalmente 169 aislamientos para su caracterización. El número de aislamientos varió según el sitio de muestreo, siendo de 22 (mayor número) para Finca Alta varietal Malbec y de 7 (menor número) para Finca Norte varietal Malbec,

ambas ubicadas en la provincia de San Juan. La región de Cuyo aportó el mayor número de aislamientos a la colección (54%), resultado coherente con que 6 de los 11 sitios procedían de dicha región. Discriminados por provincia, San Juan al igual que Salta aportaron el 37% de los aislamientos, seguidos por Mendoza (17%) y Río Negro (9%). Sin embargo, si se analiza el porcentaje de aislamientos recuperado por sitio de muestreo, resulta comparable entre sitios, salvo para Finca Norte MA y Agrelo CA (Figura IV.1).

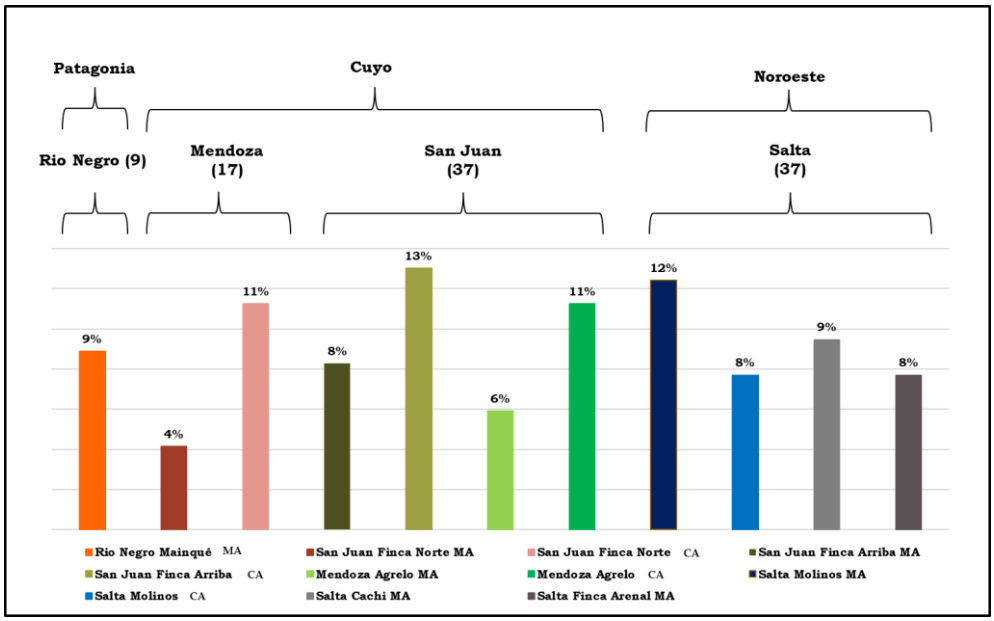

Figura IV. 1. Porcentaje de aislamientos por sitio de muestreo y región. Cada barra con su porcentaje de aislamientos recuperado por sitio. Entre paréntesis se indican los porcentajes provenientes de cada provincia. MA indica varietal Malbec y CA Cabernet Sauvignon.

La identidad de los aislamientos se obtuvo mediante espectrometría de masa de proteínas totales, aplicando el programa MALDI Biotyper (Bruker). El análisis de los datos permitió identificar el género de pertenencia de 157 de las 169 bacterias, que se distribuyeron en 12 géneros diferentes (Figura IV.2). Para el 64% de los aislamientos el programa MALDI Biotyper (Bruker) permitió la asignación de especie. Sin embargo, la exactitud en dicha asignación depende del número de espectros en la base de datos. Por esta razón, el análisis realizado en este Capítulo se basó en el género asignado.

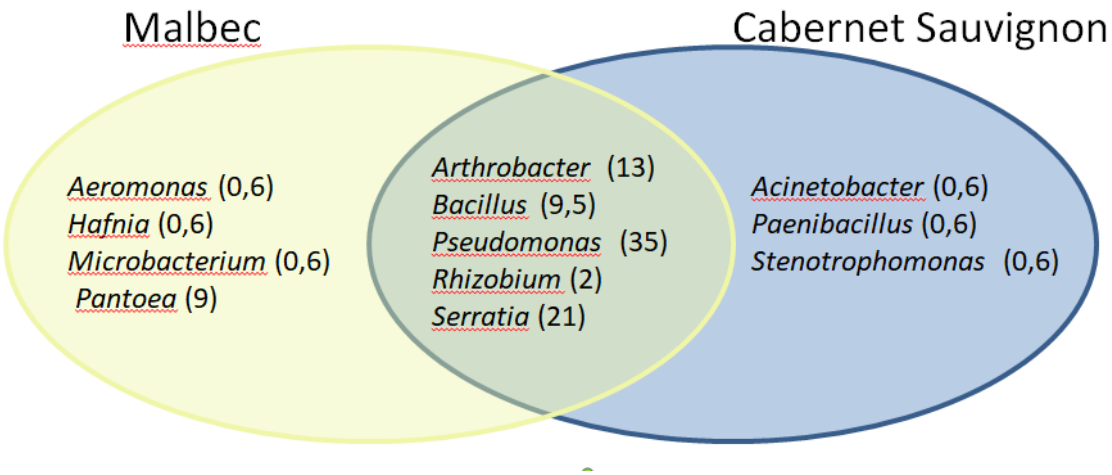

Figura IV. 2. Asignación de géneros (UV MALDI-TOF) MS a aislamientos bacterianos obtenidos de rizósfera de vid. El diagrama de Venn representa los géneros identificados a partir del varietal Malbec (amarillo), del varietal Cabernet Sauvignon (azul), o de ambos (intersección). Entre paréntesis se indica los porcentajes de cada género en la colección.

En la Figura IV.S1 se muestra la distribución de géneros, discriminados por provincia. Para analizar si la diversidad observada dependía del varietal vínico, se consideró el varietal de origen de cada aislamiento (Malbec o Cabernet Sauvignon). Cinco de los géneros identificados resultaron redundantes en ambos varietales, *Arthrobacter, Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium y Serratia.* Los géneros *Acinetobacter*, *Paenibacillus* y *Stenotrophomonas* se aislaron sólo de rizósfera de Cabernet Sauvignon, en tanto *Aeromonas*, *Hafnia*, *Microbacterium* y *Pantoea* sólo de rizósfera de Malbec. Prevalecieron los aislamientos Gram (-) (69% del total), representados mayoritariamente por los géneros *Pseudomonas* (35%), *Serratia* (21%) y *Pantoea* (9%).

El género *Pseudomonas ssp.*, resultó el más representado en la colección, siendo Salta y Cuyo el lugar de origen de los mismos. Los aislamientos Gram (+) constituyeron el 24% del total y los géneros más representados *Arthrobacter* (13%) y *Bacillus* (9,5%). Es interesante mencionar que *Arthrobacter* fue el único género aislado de rizósfera en las tres regiones vitivinícolas muestreadas. Si bien con muy pocos representantes *Microbacterium* se aisló sólo en la Patagonia; *Acinetobacter*, *Hafnia* y *Stenotrophomonas* sólo en Cuyo y *Aeromonas* y *Paenibacillus* sólo en el Noroeste.

IV.3.2. Análisis de propiedades relacionadas con promoción del crecimiento vegetal en los aislamientos de la colección

Las propiedades PGPR se caracterizaron mediante ensayos *in vitro*, evaluando la presencia de las enzimas amilasa, proteasa, celulasa y pectinasa, como así también la producción de sideróforos y la capacidad de solubilizar fosfatos. Se ha reportado que la presencia de enzimas líticas se relaciona con el proceso de colonización de diferentes órganos vegetales y el control biológico contra patógenos (Hurek et al., 1994; Gyaneshwar et al., 2001; Sindhu & Dadarwal, 2001; Abiala et al., 2015).En cuanto a los sideróforos, varios trabajos han demostrado sus beneficios sobre el crecimiento vegetal (Siebner-Freibach et al., 2003; Jin et al., 2006; Vansuyt et al., 2007; Robin et al., 2008). Por otra parte, se considera que la solubilización de fosfatos insolubles por acción microbiana provee a las plantas de una mayor fuente de fósforo (el fósforo es el segundo nutriente limitante después del nitrógeno), tanto en la naturaleza como en los agro-ecosistemas, y constituye una característica importante de los microorganismos rizosféricos.

Las cepas se cultivaron en caldo LB y se sembraron en cada medio especializado para revelar sus respectivas actividades enzimáticas, tal como se describió en Materiales y Métodos. La Figura IV.3 resume los resultados obtenidos en las pruebas con los 169 aislamientos. Se observa que un elevado porcentaje resultó capaz de sintetizar proteasas (59%), de producir sideróforos (56%) y/o de solubilizar fosfatos (47%).

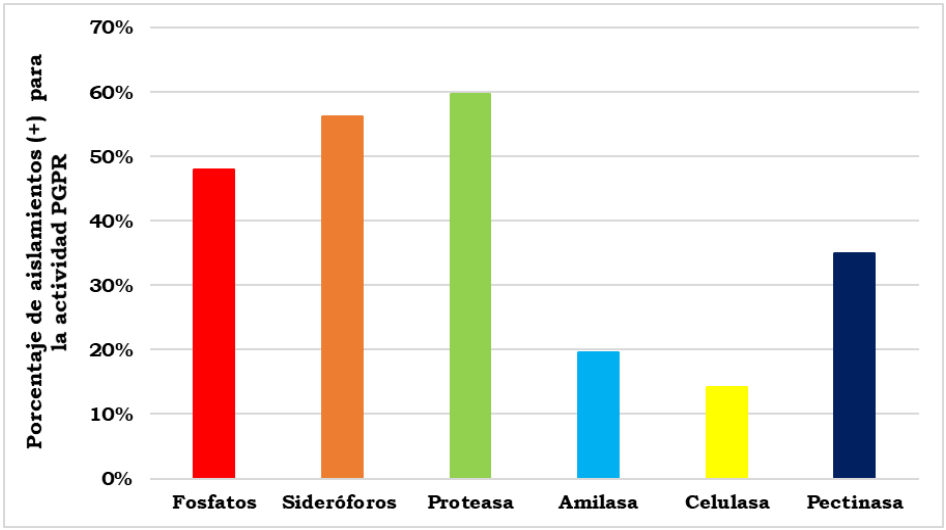

Figura IV. 3**.** Evaluación *in vitro* de caracteres asociados a la promoción del crecimiento vegetal en aislamientos recuperados de rizósfera de vid.

La Tabla IV.2 muestra el resultado de cada prueba, discriminada según el género del aislamiento. Los aislamientos con mayor capacidad de solubilizar fosfatos correspondieron al género *Pantoea*, frecuentemente citado en la bibliografía por esta característica (Son et al., 2006).

Tabla IV. 2. Actividad/es promotora/s del crecimiento vegetal asociada/s a los géneros bacterianos identificados en rizósfera de vid.

Género	Aislamientos	Solubilización de fosfatos	Producción de sideróforos	Actividad proteasa	Actividad amilasa	Actividad celulasa	Actividad pectinasa
Acinetobacter	1	0	0	1	0	0	0
Aeromonas	1	0	0	0	0	0	0
Arthrobacter	22	2	13	11	18	1	12
Bacillus	16	4	8	10	11	0	12
Hafnia	1	1	0	0	0	0	1
Microbacterium	1	1	1	0	0	0	0
Paenibacillus	1	0	0	1	1	0	1
Pantoea	15	13	10	1	1	0	1
Pseudomonas	59	32	42	39	2	4	11
Rhizobium	3	0	3	0	0	0	0
Serratia	36	23	15	30	0	10	10
Stenotrophomonas	1	1	0	1	0	0	0
No asignado	12	3	3	6	6	0	8
Total	169	80	95	100	39	15	56
Porcentaje		47,3	56,2	59,2	23,1	8,9	33,1

Los pertenecientes al género *Serratia* (Tabla V.S1) exhibieron los mayores halos de solubilización de fosfatos, hallazgo que también ha sido descripto (Singh & Jha, 2016). Los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, si bien no mostraron resultados tan prometedores, produjeron halos de hidrólisis dependiendo del aislamiento, y también se ha descripto su capacidad de solubilizar fosfatos (Kang et al., 2014; Oteino et al., 2015).

La producción de sideróforos resultó un carácter importante en aislamientos del género *Pseudomonas* (71%), tanto en cantidad como en calidad (Tabla IV.S1). Si bien en los aislamientos del género *Serratia* la proporción fue menor (42%), mostraron una importante producción de sideróforos. Los otros géneros destacados fueron *Arthrobacter* (59%), *Bacillus* (50%) y *Pantoea* (67%).

Respecto a la evaluación de la síntesis de enzimas líticas, los géneros

Arthrobacter y *Bacillus* evidenciaron actividades proteasa, amilasa y/o pectinasa. En aislamientos de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia* se detectó principalmente actividad proteasa y en los del género *Pantoea,* no se observó actividad de enzimas líticas. La Tabla IV.S1 muestra el perfil completo de actividades promotoras del crecimiento vegetal presentes en cada aislamiento, y puede apreciarse que algunos expresan varias características positivas, hecho que los posiciona como candidatos de preferencia al momento de seleccionar los más adecuados para evaluar sus efectos en la planta.

IV.3.3. Ensayos de inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos

Se analizó la capacidad de aislamientos de la colección, pertenecientes al género *Bacillus*, de inhibir el crecimiento de ciertos hongos fitopatógenos de vid y otros cultivos. Estas bacterias son PGPR eficientes y capaces de mejorar el crecimiento vegetal a través de distintos mecanismos (Compant et al., 2005; Choudhary & Johri, 2009; Aloo et al., 2018). Su capacidad de esporulación les otorga una ventaja adicional para la producción de inoculantes estables en el tiempo.

Se evaluó *in vitro* la inhibición del crecimiento de 6 hongos fitopatógenos por parte de los 15 aislamientos pertenecientes al género *Bacillus*. La elección de los hongos blanco se basó en sus efectos sobre la vid, o sobre cultivos de relevancia agronómica local o regional. *Alternaria alternata* se ha reportado como fitopatógeno de más de 380 especies vegetales; en vid produce la podredumbre de los racimos (Lorenzini & Zapparoli, 2014). *Botritis cinérea* es un hongo polífago de amplio rango de hospedadores, muy diseminado a nivel mundial; es el agente causal de la podredumbre gris en la vid, como también del kiwi, frutilla, tomate, etc. (Fillinger & Elad, 2015). Por otra parte, *Fusarium oxysporum* causa la enfermedad de Panamá en los bananeros y la marchitez vascular del tomate, además de producir más de un centenar de enfermedades en otras especies vegetales (González et al., 2012). *Fusarium graminearum* afecta principalmente a cebada y trigo, pero también a otros cultivos como centeno, arroz, avena y maíz, además de colonizar otras plantas sin necesariamente producir síntomas (Goswami & Kistler, 2004). *Penicillium expansum* es un moho psicrofílico, común en suelos de todo el mundo, que constituye un importante agente causal de enfermedades postcosecha en frutas y vegetales almacenados (Errampalli, 2014). También se analizó la acción de estos aislamientos sobre *Penicillium oxalicum*, un hongo no patógeno empleado como agente de control biológico (Sabuquillo et al., 2006).

Tabla IV. 3. Inhibición de hongos fitopatógenos por aislamientos del género *Bacillus*.

Aislamiento	*Alternaria alternata*	*Botritis cinerea*	*Fusarium oxysporum*	*Fusarium graminearum*	*Penicillium expansum*	*Penicillium oxalicum*
Tms3	-	-	-	-	-	-
Tct6	+	++	-	-	-	-
Tct11	-	-	-	-	-	-
Nmp3	-	-	-	-	-	-
Fam7	-	-	-	-	-	-
Fam11b	-	-	-	-	-	-
FACn16	-	-	-	-	-	-
FACnm	-	-	-	-	-	-
Fau8	++	-	-	-	-	-
Fau17	-	-	-	-	-	-
Fau18	++	+	+	+	-	-
Fau20	++	+	-	-	-	+
AMCv1	-	-	-	-	-	-
AMCv2	++	+	+	+	-	+
AMCv8	++	++	-	-	-	-

La Tabla IV.3. muestra los resultados de los 15 aislamientos del género *Bacillus* sobre los 6 hongos ensayados. Cinco (5) mostraron capacidad de inhibir los hongos patógenos de vid *Alternaria alternata* y *Botritis cinérea*. De estos 5, Fau20 y AMCv2 inhibieron también el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium graminearum*.

IV.4. Discusión

El potencial y la aplicación de las bacterias rizosféricas han sido ampliamente reconocidos en las últimas décadas. La estimulación del crecimiento y rendimiento vegetal por acción de estas bacterias se ha reportado en varios estudios, tanto mediante ensayos en laboratorio, en invernadero y a campo (Príncipe et al., 2007; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Glick, 2012; Abiala et al., 2015; Rolli et al., 2016; Bernabeu et al., 2018). Un factor importante a considerar cuando se analizan nuevos aislamientos, no son sólo sus actividades sino también los entornos en los que podrían aplicarse. Por estas razones, este trabajo se enfocó en la construcción de una colección de bacterias aisladas de rizósfera de vides originarias de las tres principales regiones vitivinícolas de Argentina, con el fin de analizar su potencial uso como biofertilizantes y/o agentes de biocontrol. De los más de 200 aislamientos iniciales, sólo 169 sobrevivieron a los procedimientos de re-aislamiento y conservación en frio. Esta diferencia posiblemente se deba a condiciones de cultivo

y/o de conservación no adecuadas. Mediante Espectrometría UV MALDI-TOF se logró identificar los géneros de pertenencia de la mayoría de las bacterias (157 de 169), principalmente *Pseudomonas sp., Serratia sp., Arthrobacter sp., Pantoea sp.* y *Bacillus sp.*. Estos géneros fueron reportados como integrantes habituales de rizósfera de la vid (Marasco et al., 2013; Martins et al., 2013; Salomon et al., 2013; Marasco et al., 2018).

El análisis *in vitro* de actividades promotoras del crecimiento vegetal mostró su presencia en un número importante de aislamientos de la colección. Estos resultados apoyan la propuesta relacionada con la influencia de las plantas en la composición de sus comunidades asociadas, "seleccionando" aquellos microorganismos que le permiten adaptarse a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Philippot et al., 2013). En particular, se observó que los aislamientos del género *Bacillus* exhibieron una notable producción de enzimas hidrolíticas, con la excepción de celulasa. Los miembros de los géneros *Pantoea* y *Pseudomonas*, en tanto, mostraron una interesante actividad solubilizadora de fosfatos, seguidos por los del género *Serratia*. El fósforo siendo el segundo nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, después del nitrógeno (Gyaneshwar et al., 2002).

Otra actividad analizada fue la de producción de compuestos con actividad de sideróforos, como responsables de la quelación del hierro. Este nutriente se encuentra escasamente en suelos neutros o básicos, debido a la baja solubilidad del Fe+3. En la rizósfera, la planta genera un ambiente ácido que favorece la solubilización del hierro. La capacidad de producir sideróforos otorga ventajas a los microorganismos para colonizar la rizósfera (Crowley, 2006). Además, la quelación del hierro por microorganismos benéficos puede evitar que bacterias y hongos patógenos colonicen la rizósfera (Siddiqui, 2006). El porcentaje de aislamientos de la colección que exhibió producción de sideróforos representó la tercera actividad de importancia, siendo los del género *Pseudomonas* los más relevantes en número. Beneduzi et al. (2012) hallaron que cepas de la especie *Pseudomonas putida* mostraban potencial para inhibir los hongos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, debido su capacidad de producir sideróforos.

Los hongos fitopatógenos son responsables de grandes pérdidas en cultivos a nivel mundial y se requieren alternativas al uso de productos químicos sintéticos para controlar estas enfermedades, evitando sus efectos perjudiciales sobre el medio ambiente. Por ello resultó de interés determinar la capacidad de inhibición de

crecimiento de hongos patógenos exhibida por los aislamientos de la colección pertenecientes al género *Bacillus*. La elección de los mismos se debió a su capacidad de esporular, que los convierte en candidatos ideales para desarrollar productos de biocontrol, eficientes desde un punto de vista tecnológico. Los ensayos mostraron que algunos aislamientos poseían la capacidad de inhibir importantes patógenos de la vid como *Botritis cinérea*, responsable de la podredumbre gris (Hill et al. 2018).

Como se mencionó, los microorganismos de la rizósfera de una planta particular suelen estar mejor adaptados a esa planta y a su entorno. La caracterización de los mismos permitió generar una colección de aislamientos a partir de la cual podrían seleccionarse los más interesantes en base a sus capacidades promotoras del crecimiento vegetal. Sin embargo, para avanzar en la generación de un producto, primero debería probarse su efectividad en condiciones de invernadero y luego a campo.

IV.5. Material Suplementario

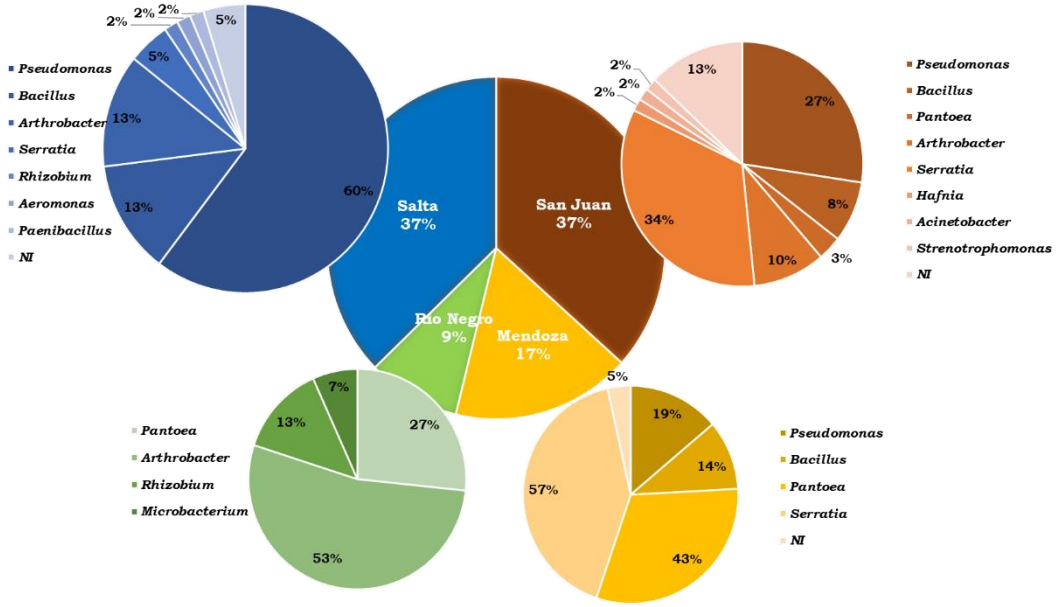

Figura IV.S1. Distribución de géneros bacterianos, identificados por UV-MALDI-TOF, según provincia vitivinícola de origen.

Tabla IV.S1. Identificación de aislamientos mediante MALDI-TOF y propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

Región	Provincia	Sitio	Varietal	Nombre	Género	Fosfatos	Sideróforos	Proteasa	Amilasa	Celulasa	Pectinasa
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr1	*Arthrobacter*	-	+	-	++	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr1C	*Arthrobacter*	-	+	++	+++	-	+
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr2	*Pantoea*	+	+	-	-	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr3	*Arthrobacter*	-	+	-	+/-	+/-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr4	*Rhizobium*	-	+	-	-	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr4.1	*Rhizobium*	-	+	-	-	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr5C	*Arthrobacter*	-	+	++	+++	+/-	+
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr7	*Pantoea*	-	+	-	-	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr8	*Arthrobacter*	-	+	-	++	-	++
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr9	*Pantoea*	++	+	+	-	-	++
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	Nmr10	*Arthrobacter*	+/-	+	-	-	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr10.1	*Arthrobacter*	-	+	-	++	-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	Nmr14	*Pantoea*	+	++	-	-	+/-	-
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr13	*Arthrobacter*	-	-	-	-	-	
Patagonia	Río Negro	Mainqué	Malbec	NMr15	*Microbacterium*	+++	+	-	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms1	*Serratia*	-	-	-	-	-	+
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms2	*Serratia*	+	+	++	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms3	*Bacillus*	-	-	-	-	-	+
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms4c	*Serratia*	+	-	+++	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms5	*Pantoea*	+	+	+/-	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms6	*Pantoea*	+++	+/-	-	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms6b	*Pantoea*	+	+	-	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms7b	*Pantoea*	+	++	-	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms8	*Pantoea*	-	++	+/-	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms10	*Serratia*	+/-	-	+++	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms12	*Serratia*	+/-	+/-	+	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms12b	*Pantoea*	++	+/-	-	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms13b	*Pantoea*	+++	+	-	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms14	*Pantoea*	++	+	-	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms14.1	*Pseudomonas*	-	-	-	-	+	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms15	*Pseudomonas*	+++	+	+/-	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms15.1	*Pantoea*	+++	+/-	-	++	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms15.2	No asignado	+	-	+++	-	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Malbec	Tms16	*Serratia*	+++	+/-	+/-	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct1	*Pseudomonas*	+/-	+	+++	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct1.1	*Serratia*	+/-	++	+++	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct4	*Serratia*	+/-	+	+	-	+/-	-

Región	Provincia	Sitio	Varietal	Nombre	Género	Fosfatos	Sideróforos	Proteasa	Amilasa	Celulasa	Pectinasa
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct5	*Serratia*	+++	+	+	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct6	*Bacillus*	+/-	+/-	+++	+++	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct7	*Serratia*	+/-	++	+++	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct8	*Serratia*	+++	+	+	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct9	*Serratia*	+++	+	+++	-	+/-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct11	*Bacillus*	+/-	+	+/-	+	-	-
Cuyo	Mendoza	Agrelo	Cabernet Sauvignon	Tct12	*Pseudomonas*	+++	+	+++	-	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp1	*Serratia*	+++	+/-	+++	-	++	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp2	*Pantoea*	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp3	*Bacillus*	+/-	-	+/-	+/-	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp4	*Serratia*	+++	+/-	++	-	+/-	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp5	*Serratia*	+++	+/-	-	-	+/-	++
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp6	*Serratia*	+++	+/-	+	-	+	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Malbec	Nmp7	*Serratia*	+++	+++	+	+/-	++	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncqm	*Serratia*	+++	+/-	++	-	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncqm.1	*Serratia*	+	-	++	-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncqm.2	*Serratia*	+	-	++	-	+	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncqb1	*Serratia*	-	+	+	-	-	+
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq1	*Serratia*	+++	++	+/-	-	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq2b	*Acinetobacter*	+/-	-	+++	-	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq3b	*Serratia*	++	++	++	+/-	++	+
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq4c	*Serratia*	+/-	++	++	-	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq5	*Serratia*	++	+/-	+/-	+/-	+/-	++
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq6	*Stenotrophomonas*	+	-	++	+/-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq8	*Serratia*	+++	+/-	+/-	-	+	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq9	*Serratia*	-	-	+++	-	+	++
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq10	*Serratia*	-	-	+++	+/-	-	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq12	*Serratia*	+++	+/-	+	-	+	-
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq12.1	*Serratia*	+	-	+++	-	+	+
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq13	*Serratia*	+++	+/-	+	+/-	+	+
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq13.1	*Serratia*	-	-	+++	-	-	+
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq15	*Serratia*	+/-	+	++	-	+/-	+
Cuyo	San Juan	Finca Norte	Cabernet Sauvignon	Ncq15c	No asignado	-	+	+++	+/-	-	++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam0b	*Pseudomonas*	+	+++	+++	-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam0c	*Pseudomonas*	-	+++	+++	-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam1c	*Pseudomonas*	+	-	+++	-	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam2c	*Pseudomonas*	-	-	++	-	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam3c	*Pantoea*	+++	-	-	-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam4c	*Pseudomonas*	-	+++	-	-	-	++

Región	Provincia	Sitio	Varietal	Nombre	Género	Fosfatos	Sideróforos	Proteasa	Amilasa	Celulasa	Pectinasa
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam5c	*Pseudomonas*	+	+	+++	-	-	+
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam6	*Pseudomonas*	+++	++	++	-	-	++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam7	*Bacillus*	-	-	++	NC	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam10	*Arthrobacter*	-	-	+++	+	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam11b	*Bacillus*	+	-	+++	+	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam13b	*Pseudomonas*	+	+++	-	-	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam14	*Hafnia*	+++	-	-	-	-	+
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Malbec	Fam15	*Arthrobacter*	-	-	+++	+	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn1	*Pseudomonas*	+/-	+/-	+/-	NC	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn2	*Pseudomonas*	+	+++	++	NC	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn3	*Pseudomonas*	+	+++	+/-	NC	+/-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn3.1	*Pseudomonas*	++	+++	+++	NC	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn4	No asignado	+/-	+/-	-	++	-	+/-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn5	No asignado	+	-	++	-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn8	No asignado	-	-	-	+++	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn9	No asignado	-	-	-	++	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn10	*Pseudomonas*	-	+++	+++	++	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn11	*Pseudomonas*	+/-	+++	+++	-	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn12	*Pseudomonas*	+++	+++	+++	-	+	NC
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn13	*Arthrobacter*	+++	+++	+++	-	+/-	NC
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn14	*Pseudomonas*	++	++	+++	-	-	+
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn15	No asignado	-	+/-	-	+	+/-	++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn16	*Bacillus*	+	-	+++	+++	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn17	*Arthrobacter*	+/-	-	++	++++	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn17.1	*Arthrobacter*	-	-	++	++	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn18	*Arthrobacter*	-	-	++	++	+	++++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn19	No asignado	-	-	++	++	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn20	*Pseudomonas*	+++	+++	+++	NC	-	-
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACn21	No asignado	-	-	-	NC	-	+++
Cuyo	San Juan	Finca Arriba	Cabernet Sauvignon	FACnm	*Bacillus*	+	-	+++	+++	-	+++
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau1	*Arthrobacter*	-	+	-	++	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau2	*Arthrobacter*	+/-	-	++	++	-	+
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau3	*Bacillus*	+/-	+	+	+/-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau4	*Pseudomonas*	+	+++	+++	+/-	+/-	+/-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau4b	*Arthrobacter*	-	++	-	++	-	+/-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau6	*Arthrobacter*	-	+	-	+++	-	+
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau7	*Pseudomonas*	+	+++	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau8	*Bacillus*	-	+++	+++	++	+/-	++
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau9	*Pseudomonas*	-	++	+	-	++	++

Región	Provincia	Sitio	Varietal	Nombre	Género	Fosfatos	Sideróforos	Proteasa	Amilasa	Celulasa	Pectinasa
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau10	*Pseudomonas*	+/-	+++	-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau11	*Pseudomonas*	+/-	+++	-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau12	*Pseudomonas*	+	+	-	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau13	*Pseudomonas*	-	NC	NC	NC	+	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau14	*Pseudomonas*	+	+	-	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau15	*Pseudomonas*	+	+	++	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau16	*Pseudomonas*	+	-	-	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau16.1	*Pseudomonas*	++	++	+	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau17	*Bacillus*	++	+	+/-	+++	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau18	*Bacillus*	-	+	+++	+++	-	++++
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau19	*Pseudomonas*	++	+++	+++	-	-	+/-
Noroeste	Salta	Molinos	Malbec	Fau20	*Bacillus*	-	+	+++	+++	-	++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv1	*Bacillus*	+/-	+++	+	+/-	+/-	+++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv2	*Bacillus*	+/-	+++	+/-	+	+/-	++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv3	*Arthrobacter*	-	+++	+	+	-	+++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv5b	No asignado	-	+	-	+	-	+++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv6	*Arthrobacter*	-	+	-	+++	-	++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv7	*Rhizobium*	-	+	-	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv8	*Bacillus*	-	-	-	+	-	++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv10	*Pseudomonas*	-	-	+/-	-	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv12	*Pseudomonas*	+/-	+++	+/-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv13	*Arthrobacter*	+	-	+	+	-	
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv14	*Paenibacillus*	+/-	+/-	+	++++	+/-	++++
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv15	*Serratia*	++	+++	+++	NC	-	-
Noroeste	Salta	Molinos	Cabernet Sauvignon	AMCv16	*Pseudomonas*	+/-	+++	+/-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw1	*Pseudomonas*	+++	+	+++	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw2	*Pseudomonas*	+	+/-	+++	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw3	*Pseudomonas*	++	+/-	+/-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw4	No asignado	+/-	+	+++	-	-	++
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw5	*Pseudomonas*	+	-	+++	-	-	+
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw6	*Pseudomonas*	+++	+	+++	-	-	NC
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw7	*Pseudomonas*	+	++	+	-	+/-	+
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw8	*No asignado*	+	-	++	-	-	+
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw9	*Pseudomonas*	+	+/-	+	+/-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw10	*Pseudomonas*	+/-	+++	+	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw11	*Pseudomonas*	+/-	+++	+/-	+/-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw12	*Pseudomonas*	+++	+++	+/-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw13	*Pseudomonas*	+	-	+++	-	-	-

Región	Provincia	Sitio	Varietal	Nombre	Género	Fosfatos	Sideróforos	Proteasa	Amilasa	Celulasa	Pectinasa
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw14	*Pseudomonas*	+	-	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw15	*Pseudomonas*	-	-	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Cachi	Malbec	Cmw16	*Pseudomonas*	-	+	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex1C	*Pseudomonas*	+/-	+++	+++	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex2	*Serratia*	-	-	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex3	*Pseudomonas*	+/-	+++	+++	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex4	*Serratia*	++	+++	++	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex5	*Pseudomonas*	+/-	-	+++	++	-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex6b	*Pseudomonas*	-	+++	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex7b	*Pseudomonas*	-	+++	+++	-	-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex8	*Pseudomonas*	+/-	+++	+++	+/-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex9	*Pseudomonas*	+	+/-	+	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex10	*Aeromonas*	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex11	*Pseudomonas*	+/-	+++	+/-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex12	*Pseudomonas*	-	+/-	+/-	-	+/-	-
Noroeste	Salta	Finca Arenal	Malbec	Aex14	*Arthrobacter*	-	-	-	+++	-	-

V. Discusión general

El desarrollo de este trabajo permitió, a través de los diferentes enfoques y estudios realizados, caracterizar y evaluar distintos aspectos del microbioma asociado a vides, así como considerar la influencia de factores bióticos y abióticos del entorno. Desde hace unos años, la implementación de tecnologías moleculares independientes de cultivo posibilitó el acceso a datos no factibles por metodologías dependientes de cultivo. Las técnicas basadas en DNA, como PCR, y la identificación de marcadores moleculares evolutivamente estables, como los genes *rRNA*, incrementaron la capacidad de identificar especies microbianas con mayor resolución y confiabilidad (Justé et al., 2008; Delmont et al., 2011; Ercolini, 2013; Cocolin et al., 2013; Belda et al., 2017; Hollins & Hodgson, 2019; Mohanram & Kumar, 2019; Siren et al., 2019). La subunidad pequeña del gen ribosomal bacteriano (*16S rRNA*), y el espaciador ribosomal eucariota ITS1- 5.8S, para hongos y levaduras, se reconocieron como estándares de oro para la valoración de la diversidad filogenética en comunidades microbianas (Justé et al., 2008; Cocolin et al., 2013; Sun & Liu, 2014). La introducción de las metodologías moleculares, no sólo significaron un avance para la microbiología sino también para la ecología microbiana. Emplean como molde DNA, directamente extraído del ambiente, con el propósito de identificar los perfiles de comunidades microbianas asociadas al mismo. PCR-DGGE fue el primer método aplicado a la fermentación vínica (Cocolin et al., 2000) con el fin de monitorear la diversidad y dinámica de poblaciones de levaduras. Si bien esta técnica resulta apropiada para analizar ambientes con baja riqueza de especies, como es el mosto de uvas, posee escasa sensibilidad (Andorrà et al., 2010) y no detecta poblaciones con abundancias relativas inferiores al 1% (Fasoli et al., 2003; Andorra et a., 2008). Más recientemente, el perfil de la comunidad microbiana de vino se analizó aplicando las técnicas de SSCP (Schmid et al., 2011; Grube et al., 2011; Martins et al., 2014) de T-RFLP (Martins et al., 2012; Sun & Liu, 2014) y de ARISA (Brežná et al., 2010; Pancher et al., 2012; Setati et al., 2012). El monitoreo de tales poblaciones resulta crítico por su influencia en la calidad del vino obtenido.

La optimización de las técnicas de secuenciación de DNA expandió la capacidad de analizar la estructura y función de comunidades microbianas con elevada resolución. El análisis metagenómico, que puede definirse como la exploración genética directa de un colectivo de genomas asociados a una muestra ambiental (Thomas et al., 2012) puede efectuarse por secuenciación del metagenoma

completo o de amplicones individuales. Esta última es una estrategia que posibilita obtener perfiles taxonómicos, filogenéticos o funcionales de comunidades microbianas, utilizando genes marcadores específicos, a partir de DNA ambiental, sin enriquecimiento ni cultivo previo de la población blanco (Franzosa et al., 2016). La innovación introducida por la tecnología *Next-Generation Sequencing* (NGS) (secuenciación de amplicones cortos), revolucionó el estudio de la diversidad microbiana dentro y entre comunidades complejas (Bokulich et al., 2013). Si bien la técnica NGS se aplicó ampliamente a la exploración de la ecología microbiana en distintos ambientes (Ma et al., 2015; Shi et al., 2015) su empleo en relación a la vid y la fermentación vínica es relativamente original, y su contribución en este campo poco explorada. En tal sentido, trabajos recientes demostraron que la diversidad microbiana asociada a uvas depende de varios factores: cultivar, condiciones climáticas (macro como microclima), condiciones ambientales estacionales, prácticas de manejo agronómico del viñedo, y tipo de proceso fermentativo aplicado en bodega (Bokulich et al., 2014; David et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Abbasian et al., 2015; Setati et al., 2015; Zarraonaindia et al., 2015; de Filippis et al., 2017; Morgan et al., 2017). Diferencias estables entre poblaciones microbianas de mostos se atribuyeron al cultivar vínico, área geográfica, factores climáticos y de sanidad del viñedo y de las uvas, conduciendo al concepto de *terroir* (Bokulich et al., 2014). Esto se vio reforzado, a nivel fenotipo-metaboloma, por trabajos como los de Knight et al. (2015), Bokulich et al. (2016) y Belda et al. (2017). Estos últimos autores hallaron perfiles metabólicos (producción de enzimas hidrolíticas) distintivos y agrupados, para cepas de levaduras, dependiendo de su origen geográfico. También se ha señalado que el origen de los microorganismos presentes en mostos son parte del consorcio microbiano asociado a las uvas, siendo su reservorio original el suelo del viñedo (Zarraonaindia et al., 2015). En consecuencia, los aspectos microbiológicos de la producción de vino resultan influenciados por el viñedo y no sólo por la bodega y los procesos fermentativos (Belda et al., 2017). Las comunidades microbianas (hongos, levaduras y bacterias) asociadas al viñedo juegan un rol importante en la productividad del suelo y en la resistencia de las vides a enfermedades. La diversidad y abundancia de microorganismos capaces de establecerse en los nichos ecológicos del suelo y de los tejidos de la vid determinarán tanto la sanidad de la planta como la variabilidad de los que logren introducirse en la bodega y afectar los procesos fermentativos y de maduración del vino (Barata et al., 2012). Por lo tanto, un adecuado manejo de la información sobre el microbioma, haría posible prevenir problemas en el proceso de fermentación, incremento de la acidez volátil,

contaminación por *Brettanomyces* y producción de aminas biogénicas en los vinos (Belda et al., 2017). Alcanzar un mayor conocimiento de las condiciones microbiológicas del viñedo permitirá al agricultor decidir cuándo resultan necesarios los tratamientos con agentes químicos. Adicionalmente, ayudará al enólogo a emplear menores concentraciones de sulfito durante el proceso de vinificación y decidir qué tipo y dosis de levadura deberá inocular, de ser necesario. Toda esta valiosa información es actualmente contemplada en las nuevas tendencias enológicas, tales como la de producción de vinos orgánicos (Belda et al., 2017).

En los Capítulos II y III, mediante secuenciación de regiones génicas marcadoras y aplicación de herramientas bioinformáticas, se pudo comprobar la influencia de una serie de factores en la riqueza y diversidad de la microbiota asociada a distintos tejidos de la vid. En particular se observó que el uso o no de portainjertos el tipo de sistema de conducción empleado, y el lugar geográfico de origen influían en la estructura de tales comunidades. La influencia del cultivar vínico (Malbec o Cabernet Sauvignon), resultó de mayor relevancia para las comunidades asociadas a uvas y hojas, no así para las asociadas a rizósfera. En el caso de la microbiota rizosférica fueron los aspectos edáficos los que resultaron más importantes.

La asignación taxonómica permitió verificar que ciertos grupos de microorganismos se encuentran siempre presentes, independientemente del origen geográfico o del tejido de la vid en estudio, y cabría suponer que cumplen funciones relacionadas con el desarrollo y sustentabilidad de las plantas. No obstante, debe también considerarse la influencia de factores bióticos, propios de cada tejido vegetal, que juegan un papel determinante en la selección y abundancia de los microorganismos que los habitan (Berendsen et al., 2012; Rincón-Flores et al., 2013). Se pudo evidenciar que las comunidades asociadas a hojas y uvas, si bien exhiben diferencias, muestran mayores similitudes entre sí que con las asociadas a rizósfera. También se comprobó que el año de vendimia influía en la estructura de las comunidades microbianas asociadas a vid, teniendo en cuenta su relación con las condiciones climáticas propias del año de cosecha.

En relación a las comunidades asociadas a rizósfera, se logró identificar grupos de bacterias generalmente relacionadas con promoción del crecimiento vegetal. Por este motivo, en el Capítulo IV, se abordó su aislamiento a partir de rizósfera de vides originarias de tres regiones vitivinícolas argentinas. Los

aislamientos se caracterizaron como potenciales biofertilizantes y/o agentes de biocontrol. Mediante Espectrometría UV MALDI-TOF se identificaron los géneros de estos aislamientos, siendo los principales *Pseudomonas, Serratia, Arthrobacter, Pantoea* y *Bacillus*. Estos géneros ya fueron descriptos como integrantes habituales de rizósfera de vid (Marasco et al., 2013, Martins et al., 2013, Salomon et al., 2014, Marasco et al., 2018). Consecuentemente, el análisis *in vitro* de sus actividades promotoras de crecimiento vegetal mostró que un amplio número de bacterias poseía capacidad potencial para su aplicación a plantas de vid. Los ensayos de biocontrol indicaron que algunas especies, como *Alternaria alternata* y *Botritis cinérea*, mostraban capacidad de inhibición de importantes patógenos de vid, responsables de distintos tipos de podredumbre. Estos hallazgos refuerzan el concepto de la influencia de las plantas en la composición de sus comunidades microbianas asociadas (Philippot et al., 2013), y la importancia de las mismas para la adaptación del cultivo a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos.

Este y otros trabajos demuestran que la aplicación de tecnologías moleculares independientes de cultivo resultan valiosas herramientas para dilucidar la significación de los factores geográficos en la estructura de la microbiota asociada a cultivos agrícolas, y más puntualmente a viñedos (Bokulich, et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Jara et al., 2016; Vitulo et al., 2019). El impacto del componente microbiológico del *terroir*, y cómo contribuye a la calidad y a las características organolépticas del vino, es considerable. También aporta a la distinción sensorial regional y al estilo del vino, que actualmente juega un rol importante en la diferenciación y la competitividad en el mercado mundial (Belda et al., 2017)

Asimismo, y por técnicas microbiológicas tradicionales, resultó posible identificar bacterias promotoras del crecimiento vegetal con potencial para el desarrollo de bioinsumos, que contribuyan a la productividad y a la sanidad de este cultivo, a través del control de enfermedades.

Si bien persisten numerosas incógnitas relacionadas con los nichos microbianos propios de los viñedos, la complementariedad de los diferentes enfoques y herramientas aplicados en este trabajo, aportan información valiosa que sirve como aproximación inicial a la comprensión de cómo se estructuran las comunidades microbianas en los viñedos. Se espera que esta información pueda constituir un insumo para la industria vitivinícola de Argentina, en el sentido de explorar las maneras de potenciar la presencia de microorganismos benéficos, destacar los

aspectos característicos que ofrecen los diversos *terroir* vitivinícolas del país y consecuentemente, mejorar su competitividad en el ámbito nacional e internacional.

VI. Referencias Bibliográficas

Abbasian, F., Lockington, R., & Mallavarapu, M. (2015). A pyrosequencing-based analysis of microbial diversity governed by ecological conditions in the Winogradsky column. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Abiala, M. A., Odebode, A. C., Hsu, S. F., & Blackwood, C. B. (2015). Phytobeneficial Properties of Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Maize in Southwestern Nigerian Soils, *81*, 4736–4743.

Acinas, S. G. (2007). Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. *SEM*, *24*, 24–29.

Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., & Nuti, M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by Brettanomyces / Dekkera bruxellensis. *International Journal of Food Microbiology*, *143*, 76–80.

Agroindustria, M. de. (2016). *Mejora del Sistema de Riego del Canal Benavidez... Documento de Factibilidad Anexo 4 : " Evaluacion de Impacto Ambientas (EIAS) " . Presidencia de la Nacion*.

Ait Barka, E., Nowak, J., & Clement, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, Burkholderia phytofirmans Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 7246–7252.

Alabouvette, C., Olivain, C., & Migheli, Quirico & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing Fusarium oxysporum. *New Phytologist*, *184*, 529–544.

Alkan, C., Bradley, C.P. & Eichler, E. E. (2011). Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet.*, *12*, 363–376.

Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2018). The Potential of Bacilli Rhizobacteria for Sustainable Crop Production and Environmental Sustainability. *Microbiological Research*, *219*, 1–18.

Amann, R. I., & Ludwig, Wolfgang & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification of individual Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Micorbiological Reviews*, *59*, 143–169.

Anagnostakis, L. H. and S. (1977). Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect. *Journal of General Microbiology*, *98*, 108–115.

Anderson, K. (2017). How might climate changes and preference changes affect the competitiveness of the world's wine regions? *Wine Economics and Policy*, *6*, 23–27.

Anderson K, Norman D & Wittwer G (2003) Globalisation of the world's wine markets. World Economy 26: 659-687.

Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, *26*, 32–46.

Anderson, M. J., Crist, T. O., Freestone, A. L., & Sanders, N. J. (2011). Navigating the multiple meanings of β-diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecology Letters*, *14*, 19–28.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Esteve-zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2010). Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques. *Food Research International*, *43*, 773–779.

Andorra, I., Landi, S., Mas, A., Guillamo, M., & Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture- independent techniques. *Food Microbiology*, *25*, 849–856.

Aziz, A., Verhagen, B., Magnin-Robert, M., Couderchet, M., Clément, C., Jeandet, P., & Trotel-Aziz, P. (2015). Effectiveness of beneficial bacteria to promote systemic resistance of grapevine to gray mold as related to phytoalexin production in vineyards. *Plant and Soil*, *405*, 141–153.

Bacon, C. W., & White, J. F. (2015). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, *68*, 87–98.

Baffi, M. A., Tobal, T., Lago, H. G., Leite, R. S. R., Gomes, E., & Da-silva, R. (2011). A Novel β -Glucosidase from Sporidiobolus pararoseus: Characterization and Application in Winemaking. *Journal of FoodScience*, *76*, 997–1002.

Baker, G.C., Smith, J.J. & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers (Review Article). *Journal of Microbiological Methods*, *55*, 541–555.

Bakker, A. W., & Schippers, B. O. B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to the potato yield reduction and the Pseudomonas SPP-Mediated plant grwth stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, *19*, 451–457.

Balestrini, R., Magurno, F., Walker, C., Lumini, E., & Bianciotto, V. (2010). Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in Vitis vinifera , a typical Mediterranean fruit crop. *Environmental Microbiology Reports*, *2*, 594–604.

Barata, A, Malfeito-Ferreira, M & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, *153*, 243–259.

Bartolini, S., Carrozza, G. P., Scalabrelli, G., & Toffanin, A. (2017). Effectiveness of Azospirillum brasilense Sp245 on young plants of Vitis vinifera L . *Open Life Sciences*, *12*, 365–372.

Beckers, B., De Beeck, M. O., Weyens, N., Boerjan, W., & Vangronsveld, J. (2017). Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome*, *5*, 1–17.

Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology: From Individuals to Ecosystems* (4th ed.). Oxford: Blackwell Publishing.

Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., & Benito, S. (2016). Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast*, *33*, 329–338.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to Wine aroma and its

intended use for Wine quality improvement. *Molecules*, *22*, 1–29.

Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the "terroir" concept. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 821.

Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., & Demchinskaya, S. V. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (Brassica juncea L . Czern.). *SoiL Biol Biochemistry*, *37*, 241–250.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010a). ITS as an environmental DNA barcode for fungi : an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, *10*, 189.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010b). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, *10*, 1–9.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, *4*, 1044–1051.

Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*, *21*, 1–11.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*, 478–486.

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 1–8.

Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., & Hallmann, J. (2005). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, *51*, 215–229.

Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, *68*, 1–13.

Bergstrom, D. W., Monreal, C. M., & St Jacques, E. (2001). Spatial dependence of soil organic carbon mass and its relationship to soil series and topography. *Canadian Journal of Soil Science*, *81*, 53–62.

Bernabeu, P. R., García, S. S., Lopez, A.C., Vio, S.A., Carrasco, N., Boiardi, J. L., & Luna, M. F. (2018). Assessment of bacterial inoculant formulated with Paraburkholderia tropica to enhance wheat productivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*, 81.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, *28*, 1327–1350.

Bik, H. M., Porazinska, D. L., Creer, S., Caporaso, J. G., Knight, R., & Thomas, W. K. (2012). Sequencing our way towards understandoing global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, *4*, 233–243.

Bissett, A., Burke, C., Cook, P. L. M., & Bowman, J. P. (2007). Bacterial community shifts in organically perturbed sediments, *9*, 46–60.

Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. *MBio*, *7*, 1–12.

Bokulich, N. A., Joseph, C. M. L., Allen, G., Benson, A. K., & Mills, D. A. (2012). Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLoS ONE*, *7*, 3–12.

Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, I., Knight, R., … Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods*, *10*, 57–59.

Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*, E139–E148.

Borneman, A. R., Schmidt, S. A., & Pretorius, I. S. (2013). At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends in Genetics*, *29*, 263–271.

Botha, A. (2011). The intimate relationship between man and yeast: It's complicated. In S. L. Center (Ed.), *Inaugural Lecture* (pp. 5–19). Stellenbosch.

Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2010). Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in Pseudomonas aeruginosa and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*, *2*, 419–425.

Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Winsconsin. *Ecological Society of America*, *27*, 325–349.

Brent K (2011) Historical perspectives of fungicide resistance. Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management, pp. 3-18.

Brown, M. R. W., & Foster, J. H. S. (1970). A simple diagnostic milk medium for Pseudomonas aeruginosa. *Journal Clinical Pathology*, *23*, 172–177.

Brussaard, L., Ruiter, P. C. D., & Brown, G. G. (2007). Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *121*, 233–244.

Bulgarelli, D., Garrido-oter, R., Mchardy, A. C., & Schulze-lefert, P. (2015). Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host and Microbe*, *17*, 392–403.

Bulgari, D., Casati, P., Quaglino, F., & Bianco, P. A. (2014). Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process. *BMC Microbiology*, *14*, 198.

Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, *46*, 237–245.

Burns, K. N., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Greenhut, R. F. (2016). Authors Soil Biology & Biochemistry Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes : Differentiation by vineyard management. *Soil*

Biology and Biochemistry, *103*, 337–348.

Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, *91*, 232–247.

Burr, T. J., & Katz, B. H. (1982). Isolation of Agrobacterium tumefaciens Biovar 3 from Grapevine Galls and Sap, and from Vineyard Soil. *Ecology and Epidemiology*, *73*, 163–165.

Cadena-zamudio, J. D., Martínez-peña, M. D., Guzman-Rodriguez, L. F., & Arteaga-Garibay, R. . (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*, *9*, 70–83.

Camprubí, A., Estaún, V., Nogales, A., Garcia-Figueres, M. P., & Calvet, C. (2008). Response of the grapevine rootstock Richter 110 to inoculation with native and selected arbuscular mycorrhizal fungi and growth performance in a replant vineyard. *Mycorrhiza*, *18*, 211–216.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., … Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data. *Nature Methods*, *7*, 335–336.

Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., & Tyson, G. W. (2013). 109. Rhizosphere Metatranscriptomics: Challenges and Opportunities. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (1st ed., Vol. 2, pp. 2–9). John Wiley & Sons, Inc.

Castañeda, L. E., & Barbosa, O. (2017). Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ*, *5*, e3098.

Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*, 14555–14561.

Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biological Control*, *48*, 489–499.

Chen, H., Lu, L., Zhao, X., Li, G., & Lin, Q. (2016). Soil microbial biomass carbon and phosphorus as affected by frequent drying – rewetting. *Soil Research*, *54*, 321–327.

Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E. S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G. D., … Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics Oxford University Press*, *28*, 2106–2113.

Cheng, G., Liu, Y., Yue, T. X., & Zhang, Z. W. (2015). Comparison between aroma compounds in wines from four Vitis vinifera grape varieties grown in different shoot positions. *Food Science and Technology*, *35*, 237–246.

Chou, M. Y., Vandel Heuvel, J., Bell, T. H., Panke-Buisse, K., & Kao-Kniffin, J. (2018). Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Scientific Reports*, *8*, 11039.

Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of Bacillus spp . and plants –

With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, *164*, 493–513.

Christensen, M. (1989). Mycologia. *Mycological Society of America*, *81*(1), 1–19.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2009). Controlled mixed culture fermentation: a new perpective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, *10*, 123–133.

Cloete, K. J., Valentine, A. J., & Botha, A. (2009). Evidence of Symbiosis Between the Soil Yeast Cryptococcus laurentii and a Sclerophyllous Medicinal Shrub , Agathosma betulina (Berg.) Pillans. *Microbial Ecology*, 624–632.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *167*, 29–43.

Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, *189*, 81–87.

Colwell, R. K., & Coddington, J. A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, *345*, 101–118.

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Soil Biology & Biochemistry Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role , colonization , mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*, 669–678.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., & Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 4951–4959.

Compant, S., Mitter, B., Colli-Mul, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of Grapevine Flowers , Berries , and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria , Comparison with Other Plant Parts , and Visualization of Niches of Colonization. *Microbial Ecology*, *62*, 188–197.

Convenio sobre la Diversidad Biológica. (1992). In *Naciones Unidas* (pp. 1–30).

Cook, J. R. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Reviews Phytopathology*, *31*, 53–80.

Corneo, P. E., Pellegrini, A., Cappellin, L., Roncador, M., Chierici, M., Gessler, C., & Pertot, I. (2013). Microbial community structure in vineyard soils across altitudinal gradients and in different seasons. *FEMS Microbiology Ecology*, *84*, 588–602.

Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). Pseudomonas fluorescens and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, *48*, 505–512.

Crowley, D. E. (2006). Chapter 8. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In *L.L. Barton and J. Abadia (eds.) Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms.* (pp. 169–198). Springer Netherlands.

Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity

and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 10494–10499.

Daler, S., & Çetin, E. (2017). Determination of the Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Applications on Kober 5 BB American Grapevine Rootstock in Lead Stress. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, *7*, 50–55.

David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Masneuf, I., Lionel, P., & Hervé, R. (2014). High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *Environmental Microbiology*, *41*, 811–821.

Deacon, L. J., Pryce-miller, E. J., Frankland, J. C., Bainbridge, B. W., Moore, P. D., & Robinson, C. H. (2006). Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*, 7–20.

Delmont, T. O., Robe, P., Cecillon, S., Ian, M., Constancias, F., Simonet, P., … Vogel, T. M. (2011). Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 1315.

Dey, G., Gupta, G. D., Ramalingam, B., Sathe, M., Mayor, S., & Thattai, M. (2014). Exploiting Cell-To-Cell Variability To Detect Cellular Perturbations. *PLoS ONE*, *9*, e90540.

Diaz Ruiz, G., & Wacher Rodarte, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, *45*, 30–40.

Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, *15*, 3–11.

Drumonde-neves, J., Franco-duarte, R., Lima, T., & Schuller, D. (2017). Association between Grape Yeast Communities and the Vineyard Ecosystems. *PLoS ONE*, *12*, e0169883.

Dry PR & Gregory GR (1988) Grapevine Varieties. Viticulture, Vol. Volume 1 Resources (Coombe BG & Dry PR, eds.), p.^pp. 119-138. Winetitles, Adelaide.

du Toit, W. J., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of Acetobacter pasteurianus and a strain of Brettanomyces bruxellensis isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, *98*, 862–871.

Easdale, M. H., Eea, I., Dra, B., Madariaga, C., & Bariloche, I. E. E. A. (2009). *Zonas Agroeconómicas Homogéneas Patagonia Norte Neuquén y Río Negro*.

Economica, S. de P. (2018). *Ministerio de Hacienda: Vitivinicola-Informes de cadenas de valor*.

Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics Oxford University Press*, *26*, 2460–2461.

Edgar, R. C. (2013). UPARSE : highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, *10*, 996–1000.

Edgar, R. C. (2016). SINTAX : a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *BioRxiv*, 20.

Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics (Oxford,*

England), *31*, 3476–3482.

Edwards, A., Pachebat, J. A., Swain, M., & Hegarty, M. (2013). A metagenomic snapshot of taxonomic and functional diversity in an alpine glacier cryoconite ecosystem. *Environmental Research Letters*, *8*, 1–11.

Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*, 3148–3155.

Errampalli D (2014) Chapter 6 - Penicillium expansum (Blue Mold). Postharvest Decay,(Bautista-Baños S, ed.) p.^pp. 189-231. Academic Press, San Diego.

Escalante, W.E, Mojmir, R., Melzoch, Sakoda, B.H., Polo, E. Q., Cervantes, Z.L., Casavilca, V.S., Quilca, G. C. (2011). Actividad fermentativa de Hanseniaspora uvarum y su importancia en la produccion de bebidas fermentadas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiologia*, *31*, 57–63.

Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, *82*, 59–70.

Feld, L., Nielsen, K., Hansen, H., Aamand, J., & Albers, N. (2016). Establishment of Bacterial Herbicide Degraders in a Rapid Sand Filter for Bioremediation of Phenoxypropionate-Polluted Groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*, 878–887.

Felice, D.V, Solfrizzo, M., Curtis, F.D., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R. (2008). Strains of Aureobasidium pullulans can lower Ochratoxin A contamination in wine grapes. *The American Phytopathological Society*, *98*, 1261–1270.

Filippis, F. De, Storia, A. La, & Blaiotta, G. (2016). Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Aglianico wine fermentation by 18s rRNA gene sequencing. *Food Microbiology*, 18.

Fillinger S & Elad Y (2015) Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems.

Fleet, G. H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, *50*, 101–117.

Fondo Vitivinicola de Mendoza. (2009). Desde los origenes hasta nuestros dias. In *Historia de la Vid y el vino*.

Frac, M., Hannula, S. E., Belka, M., & Jędryczka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–9.

Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., Cardoso, R. M., Soares, P. M. M., Cancela, J. J., … Santos, J. A. (2014). Integrated analysis of climate, soil, topography and vegetative growth in iberian viticultural regions. *PLoS ONE*, *9*, e108078.

Frankowski, J., Lorito, M., & Scala, F. (2001). Purification and properties of two chitinolytic enzymes of Serratia plymuthica HRO-C48. *Arch Microbiol*, *176*, 421–426.

Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-madi, A., Shafquat, A., Abu-, G., Morgan, X. C., … Hospital, M. G. (2016). Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol*, *13*, 360–372.

Ghazanfar, S., Azim, A., Ghazanfar, M. A. M. I., & Anjum, I. B. (2009). Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *6*, 611–622.

Gilbert, J. A., Lelie, D. V. D., & Zarraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*, 5–6.

Giovannoni, S. J., Delong, E. F., Olsen, G. J., & Pace, N. R. (1988). Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells. *Journal of Bacteriology*, *170*, 720–726.

Glick, B. . (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world ☪. *Microbiological Research*, *169*, 30–39.

Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, *2012*, 1–15.

Gobbi, A., Santini, R., Filippi, E., Ellegaard-Jensen, L. Jacobsen, C. S., & Hansen, L. H. (2018). Quantitative and qualitative evaluation of the impact of the G2 enhancer, bead sizes and lysing tubes on the bacterial community composition during DNA extraction from recalcitrant soil core samples based on community sequencing and qPCR. *BioRxiv*.

Gomes, D. (2002). EL VIÑEDO EN PORTUGAL – COSTOS DE IMPLANTACION Y LEGISLACIÓN, 1–8.

González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici-TOMATE. *Rev. Proteccion Veg.*, *27*, 1–7.

Goodwin, S., Mcpherson, J. D., & Mccombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next- generation sequencing technologies. *Nature Publishing Group*, *17*, 333–351.

Goswami, Rubella S., Kistler, H. C. (2004). Pathogen profile Heading for disaster : Fusarium graminearum on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, *5*, 515–525.

Grangeteau, C., Chloe, R.G., Rousseaux, S., Gougeon, R.D., Schmitt-kopplin, P., Alexandre, H. and Guilloux-Benatier, M. (2016). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial Biotechnology*, *0*, 000–000.

Grayston, S. J., Vaughan, D., & Jones, D. (1996). Rhizosphere carbon flow in trees , in comparison with annual plants : the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*, *5*, 29–56.

Grube, M., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, *115*, 978–986.

Guerinot, M. L., & Yi, Y. (1994). Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available'. *Plant Physiology*, *104*, 815–820.

Guerra, B., & Steenwerth, K. (2012). Influence of floor management technique on grapevine growth, disease pressure, and juice and wine composition: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *63*, 149–164.

Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-Hurek, B., & Ladha, J. K. (2001). Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of Serratia marcescens. *Journal of Bacteriology*, *183*, 2634–2645.

Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, *245*, 83–93.

Haas, D., & Défago, G. (2005). Soil-borne pathogens by Fluorescent Pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 13.

Haas, R., Zelezniak, A., Iacovacci, J., Kamrad, S., Townsend, S. J., & Ralser, M. (2017). Designing and interpreting "multi-omic" experiments that may change our understanding of biology. *Current Opinion in Systems Biology*, *6*, 37–45.

Halffter, G., Moreno, C. E., & Pineda, E. O. (2001). Manual para evaluación de la biodiversidad en Reservas de la Biosfera. *Manual &Tesis SEA*, *2*, 1–83.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, *4*, 1–9.

Handelsman, J., Rondon, M., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, *5*, 245–249.

Hannah, L., Roehrdanz, P. R., Ikegami, M., Shepard, A. V., Shaw, M. R., Tabor, G., … Hijmans, R. J. (2013). Climate change, wine, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 6907–6912.

Hansen, C. H. F., Krych, L., & Nielsen, D. S. (2012). Early life treatment with vancomycin propagates Akkermansia muciniphila and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia*, *55*, 2285–2294.

Hardoim, P. R., Overbeek, L. S. Van, Berg, G., Pirttilä, M., Compant, S., Campisano, A., & Döring, M. (2015). The Hidden World within Plants : Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbial Molecular Biology Review*, *79*, 293–320.

Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, *6*, 58.

Hedrick, D. B., Peacock, A., Stephen, J. R., Macnaughton, S. J., Bruggemann, J., & White, D. C. (2000). Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *Journal of Microbiological Methods*, *41*, 235–248.

Henick-Kling, T. & Stoewsand, G. S. (1993). L e a d in W i n e. *American Journal of Enology and Viticulture*, *44*(4), 459–463.

Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences*, *10*, 273–290.

Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores †‡. *Nature Products Reports*, *27*, 637–657.

Hill, D., Fasham, M., Tucker, G., Shewry, M., & Shaw, P. (2011). *Handbook of Biodiversity Methods Survey , Evaluation and Monitoring*. Cambridge University Press.

Hill, G. N., Beresford, R. M., & Evans, K. J. (2018). Automated analysis of aggregated datasets to identify climatic predictors of botrytis bunch rot in wine grapes. *Phytopathology*, 1–50.

Hodge A, Campbell CD, Fitter AH, 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. Nature 412: 297-299.

Hollins, S. L., & Hodgson, D. M. (2019). ScienceDirect Stress, microbiota, and immunity. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *28*, 66–71.

Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Metagenomics. *Nature*, *455*, 2006–2008.

Hurek, T., Reinhold-hurek, B., Montagu, M. van, & Kellenberger, E. (1994). Root Colonization and Systemic Spreading of Azoarcus Strain BH72 in Grasses. *Journal of Bacteriology*, *176*, 1913–1923.

INV. (2018). *INFORME ANUAL DE SUPERFICIE 2018*. Mendoza.

INV. (2019). *COMERCIALIZACIÓN DE VINOS Y MOSTOS MERCADO EXTERNO*.

Jansa, J., Bukovská, P., & Gryndler, M. (2013). Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts – or just soil free-riders? *Frontiers in Plant Science*, *4*, 1–8.

Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A., & Romero, J. (2016). Microbial terroir in chilean valleys: Diversity of non-conventional yeast. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–10.

Jayawardena, R. S., Purahong, W., Zhang, W., Wubet, T., Li, X., Liu, M., … Yan, J. (2018). *Biodiversity of fungi on Vitis vinifera L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches*. *Fungal Diversity* (Vol. 90). Springer Netherlands.

Jin, C. W., He, Y. F., Tang, C. X., Wu, P., & Zheng, S. J. (2006). Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (Trifolium pratense L.). *Plant, Cell and Environment*, *29*, 888–897.

Jones, G. V, & Schultz, H. R. (2016). Climate change and emerging cool climate wine. *Wine and Viticulture Journal*, *V31N6*, 51–53.

Jost, L. (2007). Concepts & Synthesis. *Ecology*, *88*, 2427–2439.

Jumpponen, A. A., Jones, K. L., Url, S., & Jumpponen, A. (2014). Massively Parallel 454 Sequencing Indicates Hyperdiverse Fungal Communities in Temperate Quercus macrocarpa Phyllosphere. *New Phytologist*, *184*, 438–448.

Juste, A., Lievens, B., Klingeberg, M., Michiels, C. W., Marsh, T. L., & Willems, K. A. (2008). Predominance of Tetragenococcus halophilus as the cause of sugar thick juice degradation. *Food Microbiology*, *25*, 413–421.

Kachalkin, A. V, Glushakova, A. M., Yurkov, A. M., & Chernov, I. Y. (2008). Characterization of Yeast Groupings in the Phyllosphere of Sphagnum Mosses. *Microbiology*, *77*, 474–481.

Kang, S.M., Radhakrishnan, R., Young-Hyun, Y., Joo, G.J., Lee, I.J., Lee, K.E., Kim, J. H. (2014). Phosphate Solubilizing Bacillus megaterium mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. *Indian Journal Microbiology*, *54*, 427–433.

Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M., & Kačániová, M. (2017). Microorganisms of grape berries. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, *71*, 502–508.

Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Saqlan, S. M., & Rasheed, M. (2009).

Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, *1*, 48–58.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, *286*, 885–886.

Knief, C. (2014). Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–23.

Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, *5*, 1–10.

Kogel, K. H., Franken, P., & Hu, R. (2006). Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, *9*, 358–363.

Koleff, P., Soberón, J., Arita, P. T., Dávila, O., Flores-villela, Halffter, J., … Adriana, P. (2008). Patrones de diversidad espacial en grupos selectos de especies. *Capital Natural de Mexico*, *I*, 323–364.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). Chapter 1 DNA Barcodes : Methods and Protocols. In *Methods in Molecular Biology* (W. John Kr, Vol. 858, pp. 3–8). Springer Science + Business Media, LLC 2012.

Lacoste, P. (2003). *El Vino del Inmigrante* (1a ed.). Mendoza: Inca Editorial Cooperativa de Trabajo Ltda.

Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., & Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, *5*, e2836.

Lal, S., & Tabacchioni, S. (2009). Ecology and biotechnological potential of Paenibacillus polymyxa: a minireview. *Indian Journal Microbiology*, *49*, 2–10.

Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., X., L., Laguerre, G., Boeufgras, J. M., & Alabouvette, C. (1995). Effect of Two Plant Species , Flax (Linum usitatissinum L.) and Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.), on the Diversity of Soilborne Populations of Fluorescent Pseudomonads Effect of Two Plant Species , Flax (Linum usitatissinum L.) and Tomato (Lycopersi. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 1004–1012.

Lerm, E., Engelbrecht, L., & du Toit, M. (2010). Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *31*, 186–212.

Likar, M., Hančević, K., Radić, T., & Regvar, M. (2013). Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the eastern Adriatic coast. *Mycorrhiza*, *23*, 209–219.

Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 1875–1883.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., … Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 11.

Liu, Z., Desantis, T. Z., Andersen, G. L., & Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research*, *36*, e120.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, *35*, e120.

Lonvaud-funel, A. (2001). Biogenic amines in wines : role of lactic acid bacteria, *199*, 9–13.

Lopez, J. L., Alvarez, F., Príncipe, A., Salas, E. M., Lozano, M. J., Draghi, W. O., … Lagares, A. (2018). Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (Medicago sativa) seeds. *Journal of Biotechnology*, *267*, 55–62.

López-Reyes L., Carcaño-Montiel M., Tapia-Hernández A., Jiménez-Salgado T., Mauricio- Gutiérrez A. 2015. Saberes y ciencias, 48.

Lorenz, Patrick Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, *3*, 510–516.

Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and Qualitative Beta Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities, *73*, 1576–1585.

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review Microbiology*, *63*, 541–556.

Ma, J. F. (2005). Plant Root Responses to Three Abundant Soil Minerals: Silicon, Aluminum and Iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *24*, 267–281.

Ma, Q., Qu, Y., Shen, W., Zhang, Z., Wang, J., Liu, Z., … Li, H. (2015). Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresource Technology*, *179*, 436–443.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., & Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of Aspergillus section Nigri in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, *37*, 179–184.

Magurran, A. E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Victoria: Blackwell Science Ltd.

Maicas, S., Gonzalez-Cabo, P., Ferrer, S., & Pardo, I. (1999). A Production of Oenococcus oeni biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. *Biotechnology Letters*, *21*, 349–353.

Maier T, Klepel S, Renner U, K. M. (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*, *3*.

Mair, W., Lopez-ruiz, F., Stammler, G., Clark, W., Burnett, F., Hollomon, D., … Oliver, R. P. (2016). Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. *Pest Management Science*, *72*, 1449–1459.

Mantelin, S., Touraine, B., Ii, Â. M., & Tropicales, S. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, *55*, 27–34.

Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-hadid, A., El-bahairy, U., … Daffonchio, D. (2013). Plant Growth Promotion Potential Is Equally Represented in Diverse Grapevine Root-Associated Bacterial Communities from Different

Biopedoclimatic Environments. *BioMed Research International*, *2013*, 1–17.

Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Michoud, G., & Daffonchio, D. (2018). Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*, *6*, 1–17.

Marbán, L. 2005. Acondicionamiento de la muestra de suelo previo al ensayo. Algunas consideraciones. Cap II (2), 65-67 ed Marbán, L y Ratto, S. AACS.

Marschner, P., Crowley, D. ., & Lieberei, R. (2001). Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16 S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. *Mycorrhiza*, *11*, 297–302.

Martensson, R. (2016). Species and Biological Diversity - Choices of Diversity Indices and their Potential Consequences for Nature Conservation Species and Biological Diversity Choices of Diversity Indices and their Potential, 1–28.

Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, *5*, 28.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequence from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, *17*, 10–12.

Martinez, C., Cosgaya, P., Vasquez, C., Gac, S., & Ganga, A. (2007). High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. *Journal of Applied Microbiology*, *103*, 2185–2195.

Martini, M. C. (2016). *Caracterizacion del plasmidoma presente en la comunidad bacteriana de un biofiltro construido en base turba-suelo para la decontaminacion de pesticidas*. Universidad Nacional de La Plata.

Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M. L., … Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE*, *8*, 1–9.

Martins, G., Miot-sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., & Lonvaud-funel, A. (2012). Grape berry bacterial microbiota : Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, *158*, 93–100.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., … Masneuf-pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, *177*, 21–28.

Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J., & Colwell, R. K. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature*, *4*, 102–112.

Masinova, T., Bahnmann, B.D., Vetrovsky, T., Tomsovsky, M., Merunkova, K., Baldrian, P. (2017). Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*, 1–10.

Mcneely, J. A., Miller, K. R., Reid, W. V, Mittermeier, R. A. &, & Werner, T. B. (1990). *Conserving the world's biological diversity*. IUCN, WRI, CI, WWF-US, the World Bank.

Mendes, Rodrigo, Krujit, Marco, Brujin, Irene, Dekkers, Ester, van der Voort, Menno, Schneider, Johannes H.M., Piceno, Yvette M., DeSantis, Todd Z., Anderse, Gary

L., Bakker, Peter A.H.M., Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, *332*, 1097–1100.

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*, 634–663.

Merín MG, Martín MC, Rantsiou K, Cocolin L, Morata de Ambrosini VI, 2015. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. Brazilian Journal of Microbiology 46: 815-823.

Merriman, B., & Rothberg, J. M. (2012). Progress in Ion Torrent semiconductor chip. *Electrophoresis*, *33*, 3397–3417.

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, *11*, 31–46.

Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Bruni, I., Bruno, A., Lovicu, G., Casiraghi, M., & Labra, M. (2017). Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. *PLoS ONE*, *12*, 1–20.

Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Guzzetti, L., Galimberti, A., Grando, M. S., Tardaguila, J., & Labra, M. (2018). Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–13.

Miller J.H. (1971). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Millet, V., & Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, *30*, 136–141.

Mohanram, S., & Kumar, P. (2019). Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. *Annals of Microbiology*, *69*, 307–320.

Monard, C., Gantner, S., & Stenlid, J. (2012). Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, *84*, 165–175.

Moreno, C. (2001). Metodos para medir la biodiversidad. *Manual &Tesis SEA*, *1 Zaragoza*, 84.

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L., & Cocho, J. A. (2013). A glimpse into past , present , and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, *110*, 3–24.

Morgan, H. H., du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 15.

Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., … Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, *4*, 3514–3524.

Moyer, C. L., Dobbs, F. C., & Karl, D. M. (1994). Estimation of Diversity and Community Structure through Restriction Fragment Length Polymorphism

Distribution Analysis of Bacterial 16S rRNA Genes from a Microbial Mat at an Active , Hydrothermal Vent System , Loihi Seamount , Hawaiit, *60*, 871–879.

Mozell, M. R., & Thachn, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions. *Wine Economics and Policy*, *3*, 81–89.

Mukerji, K.G, Manoharachary, C., Singh, J. (2006). *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer.

Munkvold, Lisa Kjoller, Rasmus Vestberg, Mauritz Rosendahl, S., & Jakobsen, I. (2004). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *164*, 357–364.

Muyzer, G., Waal, E. C. D. E., & Uitierlinden, A. G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*, 695–700.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., & Valori, F. (2007). Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ciencia Del Suelo (Argentina)*, *25*, 89–97.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, *170*, 265–270.

Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., & Lindow, S. E. (2003). Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of Xylella fastidiosa Colonization of Vitis vinifera. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 7319–7327.

Newton, A. C., Fitt, B. D. L., Atkins, S. D., Walters, D. R., & Daniell, T. J. (2010). Pathogenesis , parasitism and mutualism in the trophic space of microbe – plant interactions. *Trends in Microbiology*, *18*, 365–373.

Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P., & Barron, A. E. (2011). Landscape of Next-Generation Sequencing Technologies. *National Institute of Health*, *83*, 4327–4341.

Nieto, K. F., & Frankenberger, W. T. (1989). Biosynthesis of cytokinins by Azotobacter chroococcum. *Soil Biology and Biochemistry*, *21*, 967–972.

Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., & Larsson, K. (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases : A Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases : A Fungal Perspective. *PLoS ONE*, (1), e59.

Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sj, E., & Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*, *296*, 97–101.

Novello, G., Gamalero, E., Bona, E., Boatti, L., Mignone, F., Massa, N., … Berta, G. (2017). The rhizosphere bacterial microbiota of Vitis vinifera cv. Pinot Noir in an integrated pest management vineyard. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–11.

OIV. (2017). *2017 World Viticulture Situation. OIV statistical report on world vitiviniculture*.

Oldroyd, G. E.D. Murray, J.D. Poole, P.S. Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis The Rules of Engagement in the

Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, *45*, 119–144.

Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Publishing Group*, *11*, 252–263.

Oliveira, M., Arenas, M., Lage, O., Cunha, M., & Amorim, M. I. (2018). Epiphytic fungal community in Vitis vinifera of the Portuguese wine regions. *Letters in Applied Microbiology*, *66*, 93–102.

Olleveant, N.A. (1999). Tukey multiple comparison test. Journal of Clinical Nursing. Blackwell Science. 8, 229-304

Ongena, M., & Jacques, P. (2007). Bacillus lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. *Cell Press*, *16*, 115–125.

Oosthuizen, K. (2017). *Characterising the viral and microbial diversity in old and young grapevines by*. Stellenbosch University.

Ordoñes, Y. ., Fernandez, B. ., Lara, L. S., Rodriguez, A., Uribe-Velez, D., & Sanders, I. R. (2016). Bacteria with Phosphate Solubilizing Capacity Alter Mycorrhizal Fungal Growth Both Inside and Outside the Root and in the Presence of Native Microbial Communities. *PLoS ONE*, *11*, 1–18.

Orr, C. H., James, A., Leifert, C., Cooper, J. M., & Cummings, S. P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 911–919.

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates, *6*, 1–9.

Pace, N. R., Olsen, G. J., & Woeset, C. R. (1986). Ribosomal RNA Phylogeny and the Primary Lines of Evolutionary Descent Minirwiew. *Cell*, *45*, 325–326.

Paetz, A., Wilke, B.-M. M., Margesin, R., & Schinner, F. (2005). Soil Sampling and Storage. *Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*, *5*, 1–45.

Panagopoulos, C. G. 1969. The disease “Tsilik marasi” of grapevine: its description and identification of the causal agent (Xanthomonas ampefina sp. nov.). Ann. Inst. Phytopathol. Benaki N.S. 959-81.

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Maria, C., Longa, O., Yousaf, S., … Campisano, A. (2012). Fungal Endophytic Communities in Grapevines (Vitis vinifera L .) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*, 4308–4317.

Pareek, C. S., & Smoczynski, R. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal Applied Genetics*, *52*, 413–435.

Peet, R. K. (1974). The measurement of species diversity.

Pérez-miranda, S., Cabirol, N., George-téllez, R., Zamudio-rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS , a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, *70*, 127–131.

Pérez-Portuondo, I. M.-R., & Lidieska, Arelis, D.C Abalos-Rodriguez Perez-Silva, R. . (2017). Características promotoras de crecimiento vegetal en rizobacterias aisladas de suelos contaminados con compuestos fenólicos. *Revista Cubana de*

Quimica, *29*, 73–87.

Perez-Valera, E., Goberna, M., & Verdu, M. (2015). Phylogenetic structure of soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, *91*, 1–9.

Perez Rojas, F., Quispe, J. L., & Galindo Cabello, N. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (Solanum tuberosum spp . andigena Hawkes). *Revista Mexicana de Fitopatologia*, *33*, 116–139.

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 789–799.

Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS ONE*, *9*, e85622.

Portillo, C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., & Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology*, *219*, 56–63.

Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2013). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8.

Pretorius, S., Westhuizen, T. J. Van Der, & Augustyn, O. P. H. (1999). Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry . A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *20*, 61–70.

Príncipe, A., Alvarez, F., Castro, M. G., Zachi, L., Fischer, S. E., Mori, G. B., & Jofrø, E. (2007). Biocontrol and PGPR Features in Native Strains Isolated from Saline Soils of Argentina. *Current Microbiology*, *55*, 314–322.

Puspita, I. D., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K., & Nakatsu, C. H. (2012). Minireview: Are Uncultivated Bacteria Really Uncultivable? *Microbes and Environments*, *27*, 356–366.

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, Christian Alabouvette, C., & Moenne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 21.

Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Tanvir, S., Almeelbi, T., Ismail, I. M. ., & Oves, M. (2015). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*, 1–40.

Raspor, P., Mikli, D., Polanc, J., & Smole, S. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region , Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, *109*, 97–102.

Rastogi, G., Coaker, G. L., & Leveau, J. H. J. (2013). New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letters*, *348*, 1–10.

Redecker, D., Kodnerlz, R., & Grahamz, L. E. (2000). Glomalean Fungi from the Ordovician. *Reports*, *289*, 1920–1921.

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of*

Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition (Vol. 1).

Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J. M., Briat, J. F., & Lemanceau, P. (2008). Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. In *Advances in Agronomy* (Vol. 99, pp. 183–211). Academic Press.

Robinson, C. J., Bohannan, B. J. M., & Young, V. B. (2010). From Structure to Function : the Ecology of Host-Associated Microbial Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*, 453–476.

Rodriguez-R, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters. *ISME Journal*, *8*, 2349–2351.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *17*, 319–339.

Rodriguez, H., Gonzalez, T., & Goire, I. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium Azospirillum spp. *Naturwissenschaften*, *91*, 552–555.

Rolli, E., Marasco, R., Saderi, S., Corretto, E., Mapelli, F., Cherif, A., … Daffonchio, D. (2016). Root-associated bacteria promote grapevine growth: from the laboratory to the field. *Plant Soil*, *410*, 369–382.

Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., … Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, *17*, 316–331.

Rossello-Mora, Ramon Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 39–67.

Sabir, A., Yazici, M. A., Kara, Z., & Sahin, F. (2012). Growth and mineral acquisition response of grapevine rootstocks (Vitis spp.) to inoculation with different strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 2148–2153.

Sabuquillo, P., Cal, A. De, & Melgarejo, P. (2006). Biocontrol of tomato wilt by Penicillium oxalicum formulations in different crop conditions. *Biological Control*, *37*, 256–265.

Saeki, Y. (2011). 8. Characterization of Soybean-Nodulating Rhizobial Communities and Diversity. In *Soybean-Molecular Aspects of Breeding* (pp. 163–180).

Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, *2011*, 1–30.

Salamone, I. E. G. De, Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*, 404–411.

Salomon, M. V., Bottini, R., Apolinario de Souza Filho, G., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2013). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of Vitis vinifera retard water losses , induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro. *Physiologia Plantarum*, 16.

Salvetti, E., Campanaro, S., Campedelli, I., & Fracchetti, F. (2016). Whole-Metagenome-Sequencing- Based Community Profiles of Vitis vinifera L . cv. Corvina Berries Withered in Two Post-harvest Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–17.

Sandor, J. A., & Homburg, J. A. (2017). Anthropogenic Soil Change in Ancient and Traditional Agricultural Fields in Arid to Semiarid Regions of the Americas. *Journal of Ethnobiology*, *37*, 196–217.

Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, *19*, 227–240.

Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., & Paulitz, T. (2017). Disease Suppressive Soils : New Insights from the Soil Microbiome. *Phytopathology Review*, *107*, 1284–1297.

Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*, 955–962.

Schmid, F., Moser, G., Mu, H., & Berg, G. (2011). Functional and Structural Microbial Diversity in Organic and Conventional Viticulture: Organic Farming Benefits Natural Biocontrol Agents □. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 2188–2191.

Schreiner, R. P., & Mihara, K. L. (2009). The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (Vitis vinifera L.) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia*, *101*, 599–611.

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry*, *160*, 47–56.

Setati, Mathabatha E. Jacobson, D., & Bauer, F. F. (2015). Sequence-based Analysis of the Vitis vinifera L. cv Cabernet Sauvignon Grape Must Mycobiome in Three South African Vineyards Employing Distinct Agronomic Systems. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1–12.

Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U. C., & Bauer, F. (2012). The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLoS ONE*, *7*, e52609.

Setati, M. E., Jacobson, D., & Bauer, F. F. (2015). Sequence-based analysis of the Vitis vinifera L. cv cabernet sauvignon grape must mycobiome in three South African vineyards employing distinct agronomic systems. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1–12.

Shakya, M., Quince, Christopher, Campbell, J. H., Yang, Z. K., & Schadt, Christopher W. Podar, M. (2013). Comparative metagenomic and rRNA microbial diversity characterization using Archaeal and Bacterial synthetic communities. *Environmental Microbiology*, *15*, 1882–1899.

Shannon, C., & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication* (1st ed.). The University of Illinois Press, Urbana, 1964.

Shi, Y., Lalande, R., & Hamel, C. (2013). Seasonal variation of microbial biomass, activity, and community structure in soil under different tillage and phosphorus management practices. *Biology and Fertility of Soils*, *49*, 803–818.

Shi, Y., Lou, K., Li, C., Wang, L., Zhao, Z., Zhao, S., & Tian, C. (2015). Illumina-based analysis of bacterial diversity related to halophytes Salicornia europaea and Sueada aralocaspica. *Journal of Microbiology*, *53*, 678–685.

Siddiqui ZA (2006) PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization,(Siddiqui ZA, ed.) p.^pp. 111-142. Springer Netherlands, Dordrecht.

Siebner-Freibach, H., Hadar, Y. & Chen, Y. (2003). Siderophores sorbed on Ca-montmorillonite as an iron source for plants. *Plant and Soil*, *251*, 115–124.

Sierotzki, H., & Scalliet, G. (2013). A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *Phytopathology*, *103*, 880–887.

Sigut, M., Kostovćik, M., Sigutova, H., Hulcr, J., Drozd, P., & Hrcek, J. (2017). Performance of DNA metabarcoding, standard barcoding, and morphological approach in the identification of host-parasitoid interactions. *PLoS ONE*, *12*, 1–18.

Sindhu, S. S., & Dadarwal, K. R. (2001). Chitinolytic and cellulolytic Pseudomonas sp . antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by Mesorhizobium sp . Cicer in chickpea, *156*, 353–358.

Singh, P., Santoni, S., This, P., & Jean-pierre, P. (2018). Genotype-Environment Interaction Shapes the Microbial Assemblage in Grapevine ' s Phyllosphere and Carposphere: An NGS Approach. *Microorganisms*, *6*, 11.

Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The Multifarious PGPR Serratia marcescens CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (Triticum aestivum L .). *PLoS ONE*, *11*, 1–24.

Siren, K., Siu, S., Mak, T., Fischer, U., Hansen, L. H., & Gilbert, M. T. P. (2019). Multi-omics and potential applications in wine production. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 172–178.

Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., & Roskot, N. (2001). Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 4742–4751.

Smith, K. P., & Goodman, R. M. (1999). Host Variation for Interactions with Beneficial Plant-Associated Microbes. *Annual Reviews Phytopathology*, *37*, 473–491.

Smith, S. E., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.

Smith, S. E., Smith, F. A., Jakobsen, I., & Smith, S. E. (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist*, *162*, 511–524.

Soares, M. M. C. N., Silva, R. da, & Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: Characterization of the polygalacturonase produced by Bacillus sp. *Revista de Microbiologia*, *5*, 299–303.

Son, H. J., G.T., P., Cha, M. S., & Heo, M. S. H. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant Pantoea agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, *97*, 204–210.

Sotomayor-ramírez, D., Espinoza, Y., & Acosta-martínez, V. (2009). Land use effects on microbial biomass C, β -glucosidase and β-glucosaminidase activities, and availability, storage, and age of organic C in soil. *Biology and Fertility of Soils*,

45, 487–497.

Souza, R. De, Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*.

Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. & Pace, N. R. (1984). Analysis of Hodrothermal Vent-Associated Symbionts by Ribosomal RNA Sequences. *Science*, *224*(7), 409–411.

Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review Microbiology*, *39*, 321–346.

Steel, C. C., Blackman, J. W., & Schmidtke, L. M. (2013). Grapevine Bunch Rots: Impacts on Wine Composition, Quality, and Potential Procedures for the Removal of Wine Faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 5189–5206.

Steenwerth, K. L., Drenovsky, R. E., Lambert, J. J., Kluepfel, D. A., Scow, K. M., & Smart, D. R. (2008). Soil morphology, depth and grapevine root frequency influence microbial communities in a Pinot noir vineyard. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*, 1330–1340.

Stein, T. (2005). MicroReview Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, *56*, 845–857.

Sudan, A. K., & Vakhlu, J. (2015). Isolation and in silico characterization of novel esterase gene with b-lactamase fold isolated from metagenome of north western Himalayas. *3 Biotech*, *5*, 553–559.

Sugiura, T., Sakamoto, D., Koshita, Y., Sugiura, H., & Konno, S. (2017). Impact assessment of global warming on past changes in coloring of grape berry skins by using a model for estimating berry skin coloring. In E. Costes (Ed.), *X International Symposiom on Modelling in Fruit Research and Orchard Management* (pp. 341–348).

Sullivan, Daniel J. & O'Gara, F. (1992). Traits of Fluorescent Pseudomonas spp . Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews*, *56*, 662–676.

Sun, Y., & Liu, Y. (2014). Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method. *Food Microbiology*, *38*, 201–207.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*, 139–173.

Tariq, M., Noman, M., Ahmed, T., Manzoor, N., & Zafar, M. (2017). Antagonistic features displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 38–43.

Taylor, J. W., Turner, E., Townsend, J. P., Dettman, J. R., & Jacobson, D. (2006). Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, *361*, 1947–1963.

Taylor, M. W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H. A., & Goddard, M. R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal

communities. *Environmental Microbiology*, *16*, 2848–2858.

Ter Braak, C.J.F. (1986).Canonical Correspondence Analysis: A New Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. Ecology. 67: 1167-1179.

Thatcher, D. R., & Hodson, B. (1981). Denaturation of proteins and nucleic acids by thermal-gradient electrophoresis. *Biochemical Journal*, *197*, 105–109.

Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, *2*, 3.

Thompson, J. F., & Milos, P. M. (2011). The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biology*, *12*, 217.

Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., & Poole, P. S. (2015). Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *ISME Journal*, *9*, 2349–2359.

Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., & Tanabe, A. S. (2013). Sharing of Diverse Mycorrhizal and Root-Endophytic Fungi among Plant Species in an Oak-Dominated Cool – Temperate Forest. *PLoS ONE*, *8*, 1–13.

Toljander, J. F., Artursson, V., Paul, L. R., Jansson, J. K., & Finlay, R. D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters*, *254*, 34–40.

Toljander, J. F., Lindahl, D., Paul, L. R., Elfstrand, M., & Finlay, R. D. (2007). Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *Microbiol Ecol*, *61*, 295–304.

Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., & Urich, T. (2011). Nitrososphaera viennensis , an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*, 1–6.

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, *14*, 209.

Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., … Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, *428*, 37–43.

Ugliano, M., Genovese, A., & Moio, L. (2003). Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of Oenococcus oeni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5073–5078.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., … Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 1–19.

Valenzuela-gonzález, F., Casillas-hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, *41*, 297–313.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., & Dequin, S. (2007). Biodiversity of Saccharomyces yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, *7*, 317–329.

van der Heijden, M. G. A., Bardgeett, R. D., & N.M., S. (2008). The unseen majority : soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial

ecosystems. *Ecology Letters*, *11*, 296–310.

Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C., & Lemanceau, P. (2007). Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*, 441–447.

Varela, C., & Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, *34*, 111–128.

Vaudour, E., Costantini, E., Jones, G. V., & Mocali, S. (2015). An overview of the recent approaches to terroir functional modelling, footprinting and zoning. *Soil*, *1*, 287–312.

Vega-Avila, A. D., Gumiere, T., Andrade, P. A. M., Lima-Perim, J. E., Durrer, A., Baigori, M., … Andreote, F. D. (2014). Bacterial communities in the rhizosphere of Vitis vinifera L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *107*, 575–588.

Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., … Smith, H. O. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, *304*, 66–74.

Vincent R, Olivier C, Aline L, 2005. Understanding the microbial ecosystems on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Aust J Grape Wine Res, 11: 316-327

Vishniac, H. S. (2006). A Multivariate Analysis of Soil Yeasts Isolated from a Latitudinal Gradient. *Microbial Ecology*, *52*, 90–103.

Vitulo, N., José, W., Lemos, F., Calgaro, M., Confalone, M., Felis, G. E., … Nardi, T. (2019). Bark and Grape Microbiome of Vitis vinifera : Influence of Geographic Patterns and Agronomic Management on Bacterial Diversity. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–12.

Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*, *43*, 904–914.

Wang SY, Zheng GF, Li X, Yang JL, Zhang XY, Li JP & Ma LW (2017) Impact of climate warming on heat resources and freezing injuries in wine grapes at the east foot of the Helan Mountains of Ningxia. Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica 37: 3776-3786.

Wang, Y., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, *16*, 299–363.

Wang, Z., Li, T., Wen, X., Liu, Y., Han, J., & Liao, Y. (2017). Fungal Communities in Rhizosphere Soil under Conservation Tillage Shift in Response to Plant Growth. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–11.

Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, *345*, 63–65.

Wasaki, J., Rothe, A., & Kania, A. (2005). Root Exudation, Phosphorus Acquisition and Microbial Diversity in the Rhizosphere of White Lupine as Affected by Phosphorus Supply and Atmospheric Carbon Dioxide Concentration. *Journal of Environmental Quality*, *34*, 2157–2166.

Weller, D. M., Raaijmakers, Jos M. McSpadden Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens. *Annual Reviews Phytopathology*, *40*, 309–348.

West, E. R., Cother, E. J., Steel, C. C., & Ash, G. J. (2010). The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, *216*, 209–216.

Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, *107*, 127–142.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J., Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (2007). Prokaryotes : The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 6578–6583.

Williams, P. M., & Sicardi De Mallorca, M. (1982). Abscisic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of Glycine max. *Plant and Soil*, *65*, 19–26.

Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, *51*, 221–271.

Wu T, Chellemi DO, Graham JH, Martin KJ & Rosskopf EN (2008) Comparison of Soil Bacterial Communities Under Diverse Agricultural Land Management and Crop Production Practices. Microbial Ecology 55: 293-310.

Yang, C., Crowley, D. E., Borneman, J., & Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*, 3889–3894.

Yu, M., Hodgetts, J., Rossall, S., & Dickinson, M. (2009). Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) to Monitor Changes in Fungal Populations Associated with Plants. *Journal of Plant Pathology*, *91*, 417–423.

Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., … Gilbert, J. A. (2015). The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *MBio*, *6*, e02527-14.

Zelicourt, A. De, Al-yousif, M., & Hirt, H. (2013). Rhizosphere Microbes as Essential Partners for Plant Stress Tolerance. *Molecular Plant*, 1–4.

Zhang, C., Zhang, Y., Ding, Z., & Bai, Y. (2019). Contribution of Microbial Inter-kingdom Balance to Plant Health. *Molecular Plant*, *12*, 10–12.

Zhang, S., Chen, X., Zhong, Q., Huang, Z., & Bai, Z. (2017). Relations among epiphytic microbial communities from soil, leaves and grapes of the grapevine. *Frontiers in Life Science*, *10*, 73–83.

Zhang, X., Tang, X., Sheirdil, R. A., Sun, L., & Ma, X. (2015). Rhizobium rhizoryzae sp. nov., isolated from rice roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 1373–1377.

Zifcakova, L., Vetrovsky, T., Howe, A., & Baldrian, P. (2016). Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology*, *18*, 288–301.

Zinger, L., Gobet, A., & Pommiers, T. (2012). Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology*, *21*, 1878–1896.

Zou, C., Chen, A., Xiao, L., Muller, H. M., Ache, P., Haberer, G., … Zhang, H. (2017). A high-quality genome assembly of quinoa provides insights into the molecular

basis of salt bladder-based salinity tolerance and the exceptional nutritional value. *Cell Research*, *27*, 1327–1340.

Zyprian, E., Eibach, R., Trapp, O., Schwander, F., & Topper, R. (2018). Grapevine breeding under climate change: Applicability of a molecular marker linked to véraison. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, *57*, 119–123.