



Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**Efecto de un bioformulado a base de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre la incidencia del carbón del maní y rendimiento del cultivo. Impacto sobre las comunidades microbianas del suelo**

Lic. Mauricio Roque Ganuza

Directora: Dra. Adriana Mabel Torres

Codirectora: Dra. Marisa Rovera

Río Cuarto, Marzo 2019

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Nombre y apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:.....

Calificación.....

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecerle a todo el grupo de trabajo liderado por Adriana, Marisa y María, a las cuales siempre les estaré agradecido por la confianza de haberme elegido para llevar adelante este proyecto, por contribuir en mi formación profesional, por el cariño y el respeto. Además, a los compañeros del grupo de trabajo Nico, Ema, Jesi, Guille, Fran y Sofi por recibirme de una manera excelente cuando llegué, integrarme rápidamente al grupo, el compañerismo y la ayuda para poder llevar adelante este trabajo.

También, quisiera reconocer la ayuda que me brindó Moni para poder cumplir con uno de los objetivos de este trabajo. Además, por el trato excelente que recibí por parte de ella y de todo el laboratorio de suelos de la Estación Experimental del INTA Marcos Juárez, los cuales me recibieron de una manera espectacular desde el primer momento en el que llegué. Aprovecho y extiendo el agradecimiento a la Institución del INTA Marco Juárez por permitirme utilizar sus instalaciones y recibir un trato excelente de todos sus miembros.

Hago extensivo este agradecimiento a todas las personas que integran el departamento de Microbiología e Inmunología. Especialmente a las chicas de la sala de becarios por el compañerismo recibido durante todo el tiempo en el que estuve. Además, al grupo espectacular con el que íbamos a almorzar todos los días y nos divertíamos un rato.

Le agradezco a mi familia, seres queridos y amigos por estar siempre, por motivarme y desearme lo mejor siempre.

Me gustaría cerrar expresando un gran agradecimiento a la educación pública nacional e inclusiva, especialmente a la educación Universitaria, por brindarme una excelente formación de grado y de posgrado. Destacando el sobresaliente nivel académico y las investigaciones científicas, que son y serán la fuerza impulsora del crecimiento y desarrollo del país.

## Resumen

La provincia de Córdoba es el mayor productor de maní (*Arachis hypogaea* L.) de la Argentina, constituyendo un mercado muy importante a nivel local como internacional y generando una fuente de ingresos considerables para el país. En la actualidad, la enfermedad conocida como el carbón del maní (causada por *Thecaphora frezii*) está ocasionando una gran merma en la producción, lo que produce importantes pérdidas económicas en el sector. En este trabajo se utilizó la cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, la cual ya había demostrado capacidad en el control de la podredumbre parda del maní causada por *Fusarium solani*, para determinar su capacidad biocontroladora sobre el agente casual del carbón del maní en ensayos a campo. Se evaluó también el efecto de la cepa sobre la germinación de las semillas, parámetros de crecimiento de la planta y rendimiento del cultivo de maní en ensayos de cámara de crecimiento, invernadero y en tres campañas sucesivas a campo. Mediante la utilización de las técnicas de Reacción en cadena de la polimerasa seguida de una Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante y la secuenciación masiva de amplicones se evaluó el efecto de la aplicación del *T. harzianum* ITEM 3636 sobre las comunidades bacterianas y fúngicas de los suelos agrícolas. La cepa ITEM 3636 demostró efectos significativos en la estimulación de la germinación de las semillas de maní (aproximadamente 30%), aunque no se observaron efectos significativos en la promoción del crecimiento vegetal a los 75 días post siembra para ninguno de los parámetros medidos. Con respecto al rendimiento del cultivo, la cepa incrementó el peso promedio de los granos en relación al peso total de las vainas por planta (en promedio 7%), en el número de granos calidad confitería por planta (en promedio 30%) y en la masa de granos (Kg) por hectárea (en promedio 30%). La inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 redujo significativamente la incidencia (en promedio 7%) y la severidad (en promedio 25%) del carbón del maní. Por otra parte, mediante la utilización de dos técnicas moleculares, no se observaron diferencias significativas en las comunidades bacterianas y fúngicas de los suelos agrícolas al aplicar el biocontrolador. A partir de la presente Tesis se concluye que *T. harzianum* ITEM 3636 aumenta el rendimiento del cultivo y disminuye tanto la incidencia como la severidad del carbón del maní, sin causar cambios significativos en las comunidades microbianas de los suelos agrícolas. Por lo tanto, esta cepa podría ser utilizada como una herramienta de control biológico del carbón del maní, como así también biofertilizante del cultivo, en el marco de una agricultura sustentable y no contaminante.



**Abstract**

The province of Córdoba is the main area of peanut (*Arachis hypogaea* L.) production in Argentina. Such production constitutes a very important market both at a local and at an international level, and it generates a considerable income source for the country. At the present time, the disease known as peanut smut (caused by *Thecaphora frezii*) is causing great production decreases together with important economic losses. In this work, *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 was used. This strain was previously proven to be a biocontrol agent against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* and in this thesis its biocontrol activity against the causal agent of peanut smut was assessed in field assays. The effect of ITEM 3636 on seed emergence, plant growth parameters and crop yield was also evaluated both under greenhouse and field conditions. The effect of the application of *T. harzianum* ITEM 3636 on bacterial and fungal communities from field soils was studied by using the techniques Polymerase chain reaction followed by Denaturing gradient gel electrophoresis and amplicon sequencing. Strain ITEM 3636 significantly stimulated seed emergence (by approximately 30%), although plant growth promotion was not observed at 75 days post sowing. Regarding crop yield, ITEM 3636 increased the mean grain weight in relation to total pod weight per plant (by 7% on average), the number of grains with confectionery quality (by 30% on average) and grain mass (Kg) per hectare (by 30% on average). *T. harzianum* ITEM 3636 significantly reduced the incidence (by 7% on average) and the severity (by 25% on average) of peanut smut. Furthermore, through the use of two molecular techniques, no significant differences were observed on bacterial and fungal communities from field soils where the biocontrol agent had been applied. To conclude, *T. harzianum* ITEM 3636 increases crop yield and decreases the incidence and severity of peanut smut, without causing significant changes in soil microbial communities. Therefore, this strain has a great potential for being used as a biological control agent for the control of peanut smut, as well as a biofertilizer for the crop, within a sustainable and eco-friendly farming system.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Cultivo de maní	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Planta de maní	3
1.1.3. Fenología del cultivo	4
1.1.4. Patógenos de maní	6
1.2. <i>Thecaphora frezii</i>	7
1.3. Microorganismos asociados a las plantas	8
1.4. Control biológico de patógenos (biocontrol)	10
1.4.1. <i>Trichoderma</i> spp. como agente de biocontrol	12
1.5. <i>Trichoderma</i> como promotor del crecimiento vegetal	18
1.6. <i>Trichoderma</i> como endófito	22
1.7. Suelo	24
1.7.1. Generalidades	24
1.7.2. Procesos biogeoquímicos	25
1.8. Diversidad microbiana del suelo	26
1.8.1. Estudio de la diversidad microbiana del suelo	26
1.8.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	30
1.8.3. Secuenciación masiva de amplicones	31
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
2.1. Hipótesis de trabajo	35
2.2. Objetivos general y específicos	35
2.2.1. Objetivo general	35
2.2.2. Objetivos específicos	35
2.2.2.1. En invernadero	35

2.2.2.2. A campo	35
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1. Cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636	37
3.2. Tolerancia de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 al curasemilla	37
3.3. Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 sobre el crecimiento y rendimiento de maní	38
3.3.1. Material vegetal	38
3.3.2. Preparación del inóculo de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636	38
3.3.3. Ensayos en cámara de crecimiento vegetal	39
3.3.4. Ensayo en invernadero	40
3.3.4.1. Diseño experimental	40
3.3.4.2. Colonización de la rizósfera de maní	40
3.3.5. Ensayos a campo	41
3.3.5.1. Campaña 2014-2015	41
3.3.5.2. Campaña 2015-2016	42
3.3.5.2.1. Ensayo a campo 1	42
3.3.5.2.2. Ensayo a campo 2	43
3.3.5.3. Campaña 2016-2017	43
3.3.6. Efecto sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento a cosecha	43
3.4. <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 como biocontrolador del agente causal del carbón del maní	44
3.4.1. Determinación de la intensidad de la enfermedad	44
3.5. Análisis estadístico de los datos	45
3.6. Determinación de los parámetros fisicoquímicos de los suelos agrícolas	45
3.7. Identificación molecular del patógeno responsable de causar el carbón del maní	46
3.7.1. Aislamiento de <i>Thecaphora frezii</i> a partir de granos infectados	46
3.7.2. Extracción de ADN de teliosporas y amplificación por PCR de la región D1/D2	46
3.8. Caracterización genotípica y fenotípica de la cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636	47

<b>3.8.1. Caracterización genotípica</b>	47
<b>3.8.1.1. Producción de la biomasa fúngica</b>	47
<b>3.8.1.2. Extracción de ADN</b>	47
<b>3.8.1.3. Amplificación de las secuencias TEF-1<math>\alpha</math> (Factor de elongación de la traducción 1 alfa) y CAL (calmodulina) de la cepa de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636</b>	48
<b>3.8.2. Evaluación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 como potencial endófito en plantas de maní</b>	49
<b>3.8.2.1. Material vegetal</b>	49
<b>3.8.2.2. Preparación del inóculo de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636</b>	49
<b>3.8.2.3. Ensayo en invernadero</b>	49
<b>3.8.2.4. Procesamiento del material vegetal</b>	50
<b>3.9. Estudio del impacto en la diversidad microbiana del suelo agrícola frente a la aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636</b>	50
<b>3.9.1. Muestreo</b>	50
<b>3.9.2. Nomenclatura de las muestras campaña 2014-2015</b>	51
<b>3.9.3. Nomenclatura de las muestras campañas 2015-2016</b>	51
<b>3.9.4. Estudio de la diversidad microbiana del suelo agrícola por técnicas moleculares</b>	52
<b>3.9.4.1. Extracción de ADN de muestras de suelo de campo</b>	52
<b>3.9.4.2. PCR-Electroforesis en Gradiente Desnaturalizante (DGGE)</b>	53
<b>3.9.4.2.1. Amplificación del marcador molecular bacteriano</b>	53
<b>3.9.4.2.2. Amplificación del marcador molecular de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) de la subdivisión <math>\beta</math> del Filo <i>Proteobacteria</i></b>	53
<b>3.9.4.2.3. Amplificación del marcador molecular fúngico</b>	54
<b>3.9.4.2.4. Preparación de geles y condiciones de electroforesis</b>	56
<b>3.9.4.2.5. Análisis de imágenes de los perfiles DGGE</b>	56
<b>3.9.4.2.6. Determinación de la diversidad microbiana del suelo</b>	57
<b>3.9.4.2.7. Análisis estadístico de los datos obtenidos del estudio de PCR-DGGE</b>	58
<b>3.9.4.3. Estudio de secuenciación masiva de amplicones de una región parcial del gen del ARNr 16S y del espaciador de transcritos intergénicos (ITS)</b>	58
<b>3.9.4.3.1. Nomenclatura de las muestras</b>	58
<b>3.9.4.3.2. Secuenciación y análisis de secuencias</b>	58

3.9.4.3.3. Análisis estadístico de los datos obtenidos del estudio de secuenciación masiva de amplicones	60
3.9.4.3.4. Publicación en la base de datos de las secuencias obtenidas del estudio de secuenciación masiva de amplicones	60
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
4.1. Tolerancia de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 frente al curasemilla	61
4.2. Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 sobre el crecimiento y rendimiento de maní	62
4.2.1. Ensayos en cámara de crecimiento	62
4.2.2. Ensayo en invernadero	63
4.2.2.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra	63
4.2.2.2. Mediciones de peso de vainas y granos a los 120 días post siembra	65
4.2.2.3. Colonización de la rizósfera de maní	65
4.2.3. Ensayos a campo	66
4.2.3.1. Campaña 2014-2015	66
4.2.3.1.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra	66
4.2.3.1.2. Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)	68
4.2.3.1.2.1. Relación grano/caja	68
4.2.3.1.2.2. Número de granos calidad confitería	68
4.2.3.1.2.3. Rendimiento de Kg de granos/ha	69
4.2.3.2. Campaña 2015-2016	70
4.2.3.2.1. Ensayo a campo 1	70
4.2.3.2.1.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra	70
4.2.3.2.1.2. Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)	70
4.2.3.2.1.2.1. Relación grano/caja	70
4.2.3.2.1.2.2. Número de granos calidad confitería	70
4.2.3.2.1.2.3. Rendimiento de Kg de granos/ha	72
4.2.3.2.2. Ensayo a campo 2	72
4.2.3.2.2.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra	72

<b>4.2.3.2.2.2.</b> Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)	73
<b>4.2.3.2.2.2.1.</b> Relación grano/caja	73
<b>4.2.3.2.2.2.2.</b> Número de granos calidad confitería	73
<b>4.2.3.2.2.2.3.</b> Rendimiento de Kg de granos/ha	74
<b>4.2.3.3.</b> Campaña 2016-2017	75
<b>4.2.3.3.1.</b> Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)	75
<b>4.2.3.3.1.1.</b> Relación grano/caja y número de granos calidad confitería	75
<b>4.2.3.3.1.2.</b> Rendimiento de Kg de granos/ha	76
<b>4.3.</b> <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 como biocontrolador del carbón del maní	77
<b>4.3.1.</b> Campaña 2014-2015	77
<b>4.3.2.</b> Campaña 2015-2016	77
<b>4.3.3.</b> Campaña 2016-2017	78
<b>4.4.</b> Parámetros fisicoquímicos del suelo de los agrícolas	79
<b>4.5.</b> Análisis molecular para identificar <i>Thecaphora frezii</i>	80
<b>4.6.</b> Caracterización genotípica y fenotípica de la cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636	82
<b>4.6.1.</b> Análisis de similitud de secuencias de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 con secuencias de <i>Trichoderma harzianum sensu stricto</i> de una base de datos	82
<b>4.6.2.</b> <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 como posible colonizador endófito de maní	82
<b>4.7.</b> Estudio del impacto en la diversidad microbiana del suelo agrícola frente a la aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636	84
<b>4.7.1.</b> Estudio de la diversidad microbiana por PCR-Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	84
<b>4.7.1.1.</b> Campaña 2014-2015	84
<b>4.7.1.1.1.</b> Análisis de la diversidad bacteriana mediante DGGE	84
<b>4.7.1.1.2.</b> Análisis de la diversidad fúngica mediante DGGE	85
<b>4.7.1.1.3.</b> Análisis de la diversidad de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) de la subdivisión $\beta$ del Filo <i>Proteobacteria</i> mediante DGGE	86
<b>4.7.1.2.</b> Campaña 2015-2016	88
<b>4.7.1.2.1.</b> Análisis de la diversidad bacteriana mediante DGGE	88

4.7.1.2.2. Análisis de la diversidad fúngica mediante DGGE	90
4.7.2. Estudio de secuenciación masiva de amplicones de suelos tratados con el agente de biocontrol	93
4.7.2.1. Análisis de la diversidad bacteriana	93
4.7.2.1.1. Secuencias y OTUs obtenidas	93
4.7.2.1.2. Distribución de abundancias relativas bacterianas	95
4.7.2.1.3. Mapas de calor de abundancias bacterianas para los diferentes niveles taxonómicos	105
4.7.2.1.4. Análisis de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas del suelo	111
4.7.2.1.5. Análisis de la diversidad beta de las comunidades bacterianas del suelo	113
4.7.2.1.6. Análisis estadístico de los datos del estudio de diversidad bacteriana por secuenciación masiva de amplicones	116
4.7.2.2. Análisis de la diversidad fúngica	117
4.7.2.2.1. Secuencias y OTUS obtenidas	117
4.7.2.2.2. Distribución de abundancias relativas fúngicas	119
4.7.2.2.3. Mapas de calor de abundancias fúngicas para los diferentes niveles taxonómicos	130
4.7.2.2.4. Análisis de la diversidad alfa de las comunidades fúngicas del suelo	137
4.7.2.2.5. Análisis de la diversidad beta de las comunidades fúngicas del suelo	138
4.7.2.2.6. Análisis estadístico de los datos del estudio de diversidad fúngica por secuenciación masiva de amplicones	139
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>141</b>
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	<b>153</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>154</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>176</b>
8.1. Medios de cultivo	176
8.2. Soluciones	176
8.3 Microorganismos encontrados en el estudio de secuenciación masiva de amplicones	177
<b>Publicaciones científicas generadas a partir de este trabajo de Tesis</b>	<b>260</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS		Página
1	Datos obtenidos en las diferentes campañas de producción de maní en Argentina.	3
2	Cebadores utilizados para la amplificación de los marcadores moleculares en el estudio por PCR-DGGE.	55
3	Viabilidad de conidios de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 en presencia y ausencia del curasemillas.	61
4	Porcentaje de materia orgánica, pH y contenido de nitrógeno en suelos agrícolas.	81
5	Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos en el ensayo de PCR-DGGE campaña 2014-2015.	87
6	Índices de Simpson (1-D) obtenidos en el ensayo de PCR-DGGE campaña 2014-2015.	88
7	Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos en los ensayos de PCR-DGGE campaña 2015-2016.	92
8	Índices de Simpson (1-D) obtenidos en los ensayos de PCR-DGGE campaña 2015-2016.	92
9	Datos de las secuencias obtenidas para el estudio de diversidad bacteriana por secuenciación masiva de amplicones correspondientes a las muestras de suelo de las campañas 2014-2015 y 2015-2016.	94
10	Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos para las comunidades bacterianas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.	112
11	Índices de diversidad alfa obtenidos para las comunidades bacterianas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.	113
12	Datos de las secuencias obtenidas para el estudio de diversidad fúngica por secuenciación masiva de amplicones correspondientes a las muestras de suelo de las campañas 2014-2015 y 2015-2016.	118
13	Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos para las comunidades fúngicas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.	137
14	Índices de diversidad alfa obtenidos para las comunidades fúngicas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.	137
Figuras		Página
1	Ciclo de vida de <i>Thecaphora frezii</i> .	7
2	Representación de la sección longitudinal de una raíz mostrando las comunidades microbianas que habitan en la rizósfera circundante y el suelo no rizosférico.	9
3	Representación de un corte transversal de una raíz mostrando la	9



	colonización radicular por microorganismos epifíticos y endófitos.	
4	Tetraedro de la enfermedad de las plantas.	10
5	Modelo de comunicación entre la planta y <i>Trichoderma</i> .	20
6	Escala de daño para cuantificar la severidad del carbón del maní.	45
7	Tolerancia de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 al fungicida comercial Options Advance (NOVA).	61
8	Pesos aéreos y radiculares registrados a 40 días post siembra en cámara de crecimiento.	62
9	Plántulas de maní obtenidas en el ensayo en cámara de crecimiento.	62
10	Plantas de maní obtenidas en el ensayo de invernadero a 75 días post siembra.	63
11	Parámetros de crecimiento de plantas de maní registrados a 75 días post siembra en el ensayo de invernadero.	64
12	Peso de vainas (cajas) y granos de maní registrados a 120 días post siembra en el ensayo de invernadero.	65
13	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre el número de plantas de maní emergidas luego de 15 días post siembra en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015.	66
14	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre los parámetros de crecimiento de las plantas de maní registrados a 75 días post siembra en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015.	67
15	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre la relación grano/caja por planta de maní registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015.	68
16	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre el número de granos de maní calidad confitería registrados por planta a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015.	69
17	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015.	69
18	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre la relación grano/caja por planta de maní registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de Cuatro Vientos, campaña 2015-2016.	71
19	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el número promedio de granos de maní calidad confitería por planta registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de Cuatro Vientos, campaña 2015-2016.	71
20	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 (Peleteo e	72

	Inoc. surco) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de Cuatro Vientos, campaña 2015-2016.	
21	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre la relación grano/caja por planta de maní registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2015-2016.	73
22	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el número de granos de maní calidad confitería registrados por planta a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2015-2016.	74
23	Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2015-2016.	74
24	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre el número de plantas de maní emergidas luego de 15 días post siembra en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017.	75
25	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre el número promedio de granos de maní calidad confitería por planta (A) y la relación grano/caja por planta de maní (B), ambos datos registrados a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017.	76
26	Efecto del peleteo ( <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017.	76
27	Porcentaje de vainas de maní enfermas (Incidencia de la enfermedad) e Índice de Severidad Medio (MSI) registrados a cosecha (120 días post siembra) en los campos de la zona de General Cabrera, campañas 2014-2015 y 2015-2016.	78
28	Porcentaje de vainas de maní enfermas (Incidencia de la enfermedad) e Índice de Severidad Medio (MSI) registrados a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017.	79
29	Ensayo de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 como posible colonizador endófito de raíces de maní.	83
30	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2014-2015.	85
31	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de hongos totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2014-2015.	86
32	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2014-2015.	87
33	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2015-2016.	89
34	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias totales del suelo	90

del campo de la zona de Cuatro Vientos campaña 2015-2016.

35	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de hongos totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2015-2016.	91
36	Perfil de DGGE correspondiente al estudio de hongos totales del suelo del campo de la zona de Cuatro Vientos campaña 2015-2016.	91
37	Distribución del número de OTUs bacterianos obtenidos por cada muestra.	94
38	Curvas de rarefacción de las OTUs bacterianas obtenidas en el experimento de secuenciación masiva de amplicones para todas las muestras.	95
39	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Filo bacteriano presentes en los diferentes tratamientos.	98
40	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Clase bacteriana presentes en los diferentes tratamientos.	99
41	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Orden bacteriano presentes en los diferentes tratamientos.	100
42	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Familias bacterianas presentes en los diferentes tratamientos.	102
43	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Género bacteriano presentes en los diferentes tratamientos.	103
44	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Especies bacterianas presentes en los diferentes tratamientos.	104
45	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a filo bacteriana.	106
46	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a clase bacteriana.	107
47	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a orden bacteriano.	108
48	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a familia bacteriana.	109
49	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a género bacteriano.	110
50	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a especie bacteriana.	111
51	Análisis de componentes principales sobre la abundancia relativa del filo bacteriano.	114
52	Análisis de PCoA basado en unifrac ponderado (A) y unifrac no ponderado (B).	115
53	Integración del árbol de agrupación UPGMA y el histograma de la abundancia del nivel de género bacteriano, basado en unifrac no ponderado (A) y unifrac ponderado (B).	116
54	Cladograma LEfSe que informa las diferencias entre taxones bacterianos.	117
55	Distribución del número de OTUs fúngicos obtenidos por cada muestra.	119
56	Curvas de rarefacción de las OTUs fúngicas obtenidas en el experimento	119

de secuenciación masiva de amplicones para todas las muestras.

57	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Filos fúngicos presentes en los diferentes tratamientos.	122
58	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Clases fúngicas presentes en los diferentes tratamientos.	123
59	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Orden fúngico presentes en los diferentes tratamientos.	125
60	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Familias fúngicas presentes en los diferentes tratamientos.	126
61	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Géneros fúngicos presentes en los diferentes tratamientos.	128
62	Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Especies fúngicas presentes en los diferentes tratamientos.	129
63	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a filo fúngico.	131
64	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a clase fúngica.	132
65	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a orden fúngico.	133
66	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a familia fúngica.	134
67	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a género fúngico.	135
68	Mapa de calor de la abundancia correspondiente a especie fúngica.	136
69	Análisis de PCoA basado en Bray Curtis para las comunidades fúngicas del suelo de ambas campañas.	138
70	Integración del árbol de agrupación de UPGMA y el histograma de abundancia de género en el gráfico basado en Bray Curtis.	139
71	Cladograma LEfSe que informa las diferencias entre taxones fúngicos.	140

---

## Abreviaturas

<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µm</b>	Micómetro
<b>1-D</b>	1-Índice de Simpson
<b>6-PP</b>	6 pentil-α-pirona
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ACBs</b>	Agentes de control biológico
<b>ACC</b>	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
<b>ACCD</b>	ACC desaminasa
<b>ACCS</b>	ACC sintasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico de interferencia
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BOA</b>	Bacterias oxidantes del amoníaco
<b>Ca</b>	Calcio
<b>Cks</b>	Citoquinas
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa
<b>Cu</b>	Cobre
<b>CWDEs</b>	Enzimas degradadoras de pared y membrana celular
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados al daño
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>Dps</b>	Días post siembra
<b>ET</b>	Etileno
<b>ETI</b>	Inmunidad inducida por efectores
<b>ETS</b>	Susceptibilidad inducida por efectores
<b>FAME</b>	Análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos
<b>Fe</b>	Hierro
<b>G</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>GAs</b>	Giberelinas
<b>Gb</b>	Gigabase
<b>H</b>	Hora

<b>H'</b>	Índice de Shannon
<b>HA</b>	Ácido harziánico
<b>HR</b>	Respuesta hipersensible
<b>IAA</b>	Ácido indolacético
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>ITS</b>	Espaciadores de transcritos intergénicos
<b>JA</b>	Ácido jasmónico
<b>K</b>	Potasio
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>kg/ha</b>	Kilogramo/hectárea
<b>LEfSe</b>	Efecto del tamaño sobre el análisis de línea discriminante
<b>LRR</b>	Dominios ricos en leucinas
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperio
<b>MAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a microbios
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>Mg</b>	Miligramo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>Min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>MSI</b>	Índice de Severidad Medio
<b>MTI</b>	Inmunidad desencadenada por MAMPs
<b>Na</b>	Sodio
<b>NBS</b>	Dominios de unión a nucleótidos
<b>Ng</b>	Nanogramos
<b>NGS</b>	Secuenciación de próxima generación
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>OTU</b>	Unidades taxonómicas operacionales
<b>P</b>	Fósforo
<b>p/v</b>	Peso en volumen
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>Pb</b>	Pares de bases

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>PTI</b>	Inmunidad desencadenada por PAMPs
<b>qq/ha</b>	Quintales /hectárea
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
<b>RISA</b>	Análisis de espaciadores intergénicos ribosomales
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	Segundo
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SAR</b>	Resistencia sistémica adquirida
<b>SSU rRNA</b>	Subunidad menor del ARN ribosomal
<b>TGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
<b>Tn</b>	Toneladas
<b>U</b>	Unidades
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>V</b>	Voltio
<b>v/v</b>	Volumen en volumen
<b>Zn</b>	Zinc

## 1. Introducción

### 1.1. Cultivo de maní

#### 1.1.1. Generalidades

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es una planta de la familia de las leguminosas y es originaria de América del Sur, especialmente de la región noroeste y sudeste de Argentina y Bolivia, respectivamente (Fernández y Giayetto, 2006). Su cultivo se diseminó por el resto del mundo cuando los colonizadores españoles descubrieron su versatilidad. La planta de maní es anual, herbácea de porte erecto o rastrero, botánicamente pertenece al orden *Fabales* familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, subfamilia *Papilionidea*, tribu *Aeschynomeneae*, género *Arachis*, especie *hypogaea* L. (Krapovickas y Gregory, 1994).

El cultivo de maní necesita un suelo de estructura liviana (favorece a la inserción de los ginóforos, a los cuales vulgarmente se los conoce como clavos), franco-arenoso, bien drenado, libre de sales, levemente ácido (pH 6 a 6,5) y con un buen contenido de materia orgánica. Además, como toda leguminosa, necesita la aireación suficiente para la fijación de nitrógeno. La rotación de cultivos, especialmente con gramíneas como sorgo, maíz o pasturas, es determinante en la obtención de un buen rendimiento (Pedelini, 2008). También, como cultivo esencialmente tropical, requiere de una temporada larga de clima cálido para su crecimiento. Las condiciones climáticas favorables para el maní, son precipitaciones bien distribuidas, de al menos 500 mm durante la fase de crecimiento del cultivo y una elevada radiación solar. La temperatura ambiente debe estar en un intervalo de 25 a 30°C, que es la temperatura óptima para el desarrollo de la planta (Prasad *et al.*, 2003), mientras que el suelo debe alcanzar los 16°C para favorecer el crecimiento (Pedelini, 2008). Una vez establecido, el maní es tolerante a la sequía y en cierta medida también tolera exceso de humedad. Una precipitación acumulada de 500 a 1000 mm durante el ciclo del cultivo, permitiría una adecuada producción comercial, aunque rendimientos aceptables pueden ser alcanzados con sólo 300 a 400 mm de lluvia (Andrés *et al.*, 2016).

El fruto del maní, el cual puede ser utilizado en su totalidad, presenta un elevado valor nutricional de las semilla. Esto es entre 48 a 50% de aceites, 25 a 38% de proteínas y 20 a 26% de carbohidratos. Además, contiene 7 minerales esenciales, 13 vitaminas (especialmente la vitamina E), ácido fólico, niacina y antioxidantes (Bishi *et al.*, 2015). También es una fuente dietaria de polifenoles, flavonoides e isoflavones, tales como, ácido p-cumárico y resveratrol (Francisco y Resurrección, 2008). Asimismo, el grano de



maní es rico en ácidos grasos monoinsaturados y no contiene ácidos grasos trans-insaturados (Sanders, 2001). Por todo esto, este cultivo, constituye un alimento nutritivamente valioso para la alimentación de las personas y hay numerosos trabajos en donde se observa una mejora en la salud de las personas al consumirlo (Andrés *et al.*, 2016).

El maní se produce y comercializa como materia prima de la industria aceitera y alimenticia. Dentro de los productos elaborados con maní están:

- Maní confitería: Entero, partido y blanchado o sin tegumento. Es consumido directamente por las personas, luego de un proceso de tostado, salado y agregado de saborizantes.
- Pasta y manteca de maní: producto semisólido proveniente de la molienda de granos de baja granometría proveniente del maní blanchado y tostado.
- Grana de maní: grano partido en pequeños fragmentos y es utilizado en la industria alimenticia.
- Aceite de maní: utilizado en la elaboración de aceites mezcla y como saborizante en la industria de panificación y confitería. Es un producto de gran valor económico y calidad, es decir, por el tipo y cantidad de aceites obtenidos.
- Harina y pellets de maní: elemento muy requerido por los fabricantes de alimentos balanceados por su elevado contenido de proteínas.
- Cáscara de maní: se utiliza como suplemento de alimento balanceado, producción de carbón activado y generación de energía eléctrica.

El volumen destinado para la producción de cada uno de estos productos depende de la calidad de los granos (granometría).

Entre los años 2002 y 2012 se produjo un incremento sustancial de 89% en la producción nacional de maní, pasando de 362 mil toneladas a 685 mil toneladas, respectivamente. En la tabla 1 se puede observar el registro de las últimas campañas nacionales de maní (desde la campaña 2011/2012 a la 2016/2017), en donde toda la producción se concentra en las Provincias de Córdoba, La Pampa y San Luis. Si se tiene en cuenta la cantidad total de hectáreas sembradas en las diferentes campañas, no se observa un cambio importante, encontrando que el máximo de hectáreas sembradas se produjo en la campaña 2013/2014 (383.100 ha) y el valor mínimo se registró en la campaña 2015/2016 (336.426 ha). El número final de hectáreas totales cosechadas, depende de la cantidad de hectáreas perdidas, las cuales variaron para las diferentes campañas, observándose un valor máximo para el período 2015/2016 con aproximadamente 47.000 ha perdidas. Los motivos principales de pérdida de hectáreas sembradas fueron las condiciones

climáticas y las enfermedades. Respecto a éstas, los principales agentes causales reportados en la Provincia de Córdoba fueron *Sclerotinia sp.*, *Fusarium sp.* y *Thecaphora frezii*. La mayor producción se obtuvo en la campaña 2016/2017 con 900.000 Tn de granos aproximadamente, si bien no fue la campaña con el mayor número de hectáreas sembradas. El motivo por el cual se obtuvo la mayor producción fue debido a que se alcanzó el mejor rendimiento promedio de 39,8 qq/ha. Cabe resaltar que en el Sudoeste de la Provincia de Córdoba se produce más del 90% del maní argentino, en especial en los Departamentos General Roca, Río Cuarto y Juárez Celman (Bolsa de Cereales de Córdoba). Más del 80% de la producción nacional es exportado a la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, China e India, lo cual remarca su importancia no solo local sino que también para el mercado mundial de maní (Rago *et al.*, 2017).

**Tabla 1:** Datos obtenidos en las diferentes campañas de producción de maní en Argentina.

	Campañas						
	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	
<b>Córdoba</b>	Hectáreas Sembradas	336391	351841	344041	322700	313500	328600
	Hectáreas Perdidas	0	7386	4211	3900	43300	30700
	Hectáreas Cosechadas	336391	344455	339830	318800	270200	297900
	Rendimiento en caja (qq/ha)	28,2	27,2	27,0	34,6	31,8	39,6
	Producción en caja (Tn)	948800	937800	916000	1102200	859200	1179300
	Producción en grano (Tn)	621300	602300	618700	778700	618100	825500
<b>La Pampa</b>	Hectáreas Sembradas	6671	11788	14361	11398	18345	11312
	Hectáreas Perdidas	0	0	1243	0	3724	1806
	Hectáreas Cosechadas	6671	11788	13118	11398	14621	9506
	Rendimiento en caja (qq/ha)	40,6	23,0	14,6	33,8	36,7	40,0
	Producción en caja (Tn)	27084	27112	19218	38525	53660	38022
	Producción en grano (Tn)	17605	13827	12204	27045	41318	26616
<b>San Luis</b>	Hectáreas Sembradas	16360	24236	24715	11052	4546	16623
	Hectáreas Perdidas	0	0	0	0	45	499
	Hectáreas Cosechadas	16360	24236	24715	11052	4501	16124
	Rendimiento en caja (qq/ha)	28,5	21,2	25,1	43,1	35	44
	Producción en caja (Tn)	46626	51380	62035	47636	15752	70947
	Producción en grano (Tn)	29561	32370	41998	33821	11184	49663
<b>Total</b>	Hectáreas Sembradas	359400	387900	383100	345200	336426	356500
	Hectáreas Perdidas	0	7400	5400	4000	47056	32900
	Hectáreas Cosechadas	359400	380500	377700	341200	289370	323600
	Rendimiento en caja (qq/ha)	28,4	26,7	26,4	34,8	32,1	39,8
	Producción en caja (Tn)	1022500	1016300	997200	1188400	928614	1288300
	Producción en grano (Tn)	668500	648500	672900	839600	670588	901800

Fuente: Bolsa de Cereales de Córdoba. Los sufijos qq/ha corresponde a quintales/hectárea y Tn corresponde a toneladas.

## 1.1.2. Planta de maní

La planta de maní posee una longitud de 30 a 80 cm, con un sistema radicular formado por una raíz principal de 30 a 60 cm de longitud y raíces laterales que salen a diferentes alturas de la raíz principal. Además, en la raíces, es común encontrar la presencia de una

gran cantidad de nódulos producidos por simbiosis que establecen con rizobios encargados de la fijación de nitrógeno atmosférico (Fernández y Giayetto, 2017).

El eje central de la planta es siempre erecto y puede o no, poseer inflorescencias. Las ramas secundarias pueden ser erectas, rastreras o intermedias. Los nudos de la plantas son vegetativos cuando dan origen a una rama o bien reproductivos cuando en ellos se forman inflorescencias. Las hojas son tetrafoliadas, el tamaño y la tonalidad del color varían con el tipo botánico y las condiciones ambientales. Las inflorescencias que se originan en los nudos reproductivos comprenden 3 a 5 flores generalmente de corola amarilla. Una vez producida la fecundación, se alarga la base del ovario generando una estructura denominada ginóforo o "clavo" que lleva en su extremo él o los óvulos fecundados. El clavo se dirige hacia el suelo, donde se entierra y se transforma en el fruto, denominado geocarpo o "caja". Luego de su penetración al suelo, cesa su crecimiento y comienza a desarrollarse el fruto en el extremo distal el cual adquiere posición horizontal donde está ubicado el ovario. Para que el fruto se desarrolle normalmente es necesario que se den condiciones de oscuridad, estímulos mecánicos del medio, humedad y calcio (Fernández y Giayetto, 2017). Esta es una legumbre unilocular denominada geocarpo, que contiene 2 a 5 semillas, o por aborto, solo una. Dichas semillas cuentan con un tegumento rojizo, violáceo-oscuro o blanco (Bianco *et al.*, 2006). Los frutos son indehiscentes, constituidos por un pericarpo que encierra de 1 a 5 semillas. El pericarpo está formado por tres capas de tejidos: exo, meso y endocarpo. En etapas tempranas de su desarrollo los frutos pueden absorber agua y nutrientes, principalmente calcio. Las semillas son alargadas o redondeadas con tegumento muy delgado y el peso de la semilla puede variar entre 0,3 a 1,5 gr (Fernández y Giayetto, 2017).

### **1.1.3. Fenología del cultivo**

La descripción fenológica está basada en la observación macroscópica de eventos vegetativos y reproductivos que se suceden durante la vida de la planta o el cultivo de maní. En este cultivo, al igual que ocurre en otros, se pueden distinguir dos períodos: el vegetativo (V) y el reproductivo (R), que fueron descritos por Boote (1982). A partir de cierta edad de la planta ambos son concurrentes debido al alto grado de indeterminación que posee la especie. La duración de las diferentes etapas está afectada por la temperatura, el contenido hídrico y de minerales del suelo, el fotoperíodo y el genotipo (Fernández y Giayetto, 2017).

Los estadios son (Adaptado por Cholaky, 1996):

- Estado vegetativo (Ve) o emergencia: Cotiledones cerca de la superficie del suelo y plántula mostrando alguna de sus partes.
- Estado V0 o cotiledonar: Cotiledones abiertos y horizontales en la superficie del suelo.
- Estado V1 o primera hoja tetrafoliada: Primer nudo desarrollado sobre el eje principal con su hoja tetrafoliada desplegada y folíolos horizontales.
- Estado Vn o n hojas tetrafoliadas: n nudos desarrollados sobre el eje principal con o sin sus hojas tetrafoliadas desplegadas y folíolos horizontales.
- Estado R1 o inicio de floración: Cuando el 50% de las plantas tienen o han tenido una flor abierta. El número de días a R1 está determinado principalmente por la temperatura y es casi insensible al fotoperíodo. En Córdoba, Argentina, este estado se alcanza entre 30 y 40 días después de la emergencia.
- Estado R2 o inicio de formación del ginóforo: Cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un clavo elongándose, independientemente de la penetración al suelo. Generalmente, en condiciones sin estrés, el período desde la fecundación hasta que la base del ovario fertilizado comienza a elongarse, lleva 5 a 7 días. El proceso de elongación propiamente dicho lleva 1 a 2 días.
- Estado R3 o inicio de formación de fruto: Cuando el 50% de las plantas tienen un clavo elongado con el extremo (ovario) de un diámetro igual a dos veces el diámetro del clavo.
- Estado R4 o fruto completamente desarrollado: Para la definición de este estado se utiliza la característica del máximo tamaño de frutos que es dependiente del cultivar. Se alcanza este estado cuando el 50% de las plantas tiene la primera caja completamente expandida, es decir ha llegado a su máximo tamaño. En este estado el crecimiento vegetativo sigue siendo el máximo, pero la planta está comenzando a adicionar significativamente número y peso de frutos.
- Estado R5 o inicio de formación de semillas: Cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto completamente desarrollado, que al ser seccionado por la mitad, se puede observar sin dificultad los cotiledones.
- Estado R6 o semilla completamente desarrollada: Cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto con las semillas que ocupan el volumen total de las cavidades de la caja. El endocarpo fresco y esponjoso que ocupa el volumen que deja la semilla se encuentra comprimido a una capa algodonosa. En ese estado las semillas tienen un alto contenido de humedad, alcanzaron el máximo volumen, pero aún no llegaron a su máximo peso seco. Así, el estado R6 no marca el fin del

llenado de las semillas aún para el primer fruto. Este estado ocurre antes de llegar a la carga de frutos completa. El período de adición de frutos continúa una a dos semanas posterior a alcanzar este estado.

- Estado R7 o inicio de madurez: Ocurre cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto con una coloración canela o marrón en la cara interna del pericarpo.
- Estado R8 o madurez de cosecha: Ocurre igual a R7 solo que depende del porcentaje de plantas del cultivar sembrado. Este porcentaje varía según el genotipo y el ambiente. Así, un valor de 70 a 75% para el tipo comercial Virginia y Español, y 80% para el tipo Valencia.
- Estado R9 o frutos sobremaduros: Se llega a este estado cuando las plantas comienzan a tener frutos sanos con el pericarpo con coloración anaranjado oscura y/o un deterioro natural.

### 1.1.4. Patógenos de maní

El cultivo de maní es susceptible a una gran cantidad de enfermedades que se desarrollan por un conjunto de factores como son un cultivar susceptible a enfermedades, patógenos (hongos, bacterias y virus) y un entorno favorable. Dentro de este último no solo se incluye el clima, sino también las prácticas agrícolas y el sistema de producción, que tienen una gran influencia en la diseminación de los fitopatógenos (Marinelli y March, 2005).

Las enfermedades pueden clasificarse en dos grandes grupos. Por un lado, están las asociadas al follaje de la planta denominadas enfermedades de filoplano; por otro lado, están las enfermedades de la raíz de la planta que se denominan enfermedades del rizoplano. En el primer grupo se encuentran la viruela, la sarna, la mancha de humedad y el moho, mientras que en el otro grupo se encuentran plagas que provocan que se marchite o pudra la raíz.

Algunos de los patógenos que afectan los cultivos de maní en la Argentina y causan grandes pérdidas económicas en cada campaña son: *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum*, *Sphaceloma arachidis* y *Thecaphora frezzi* (Andrés et al., 2016).

1.2. *Thecaphora frezii*

*Thecaphora frezii* fue descrito por Carranza y Lindquist en 1962 por infectar maní silvestre (*Arachis* sp.) en Brasil y por ello se lo identificó como el agente causal de la enfermedad conocida como carbón del maní. En Argentina fue detectado por primera vez en las áreas centro y norte de la Provincia de Córdoba en el año 1995 por Marinelli *et al.* (1995), además reportes hechos a partir del año 2000 indican importantes pérdidas en la producción, alcanzando 51% de pérdidas en algunas localidades. En la actualidad, la enfermedad, se extiende en una gran porción del territorio Nacional (aproximadamente 345.000 ha), aunque principalmente se encuentra en la región central de Córdoba próxima a las principales plantas de procesamiento de granos. Hasta el momento Argentina es el único país en donde se ha reportado la enfermedad en cultivos comerciales de maní, no obstante hay casos reportados en Bolivia y Brasil de carbón en maní silvestre (Rago *et. al*, 2017).

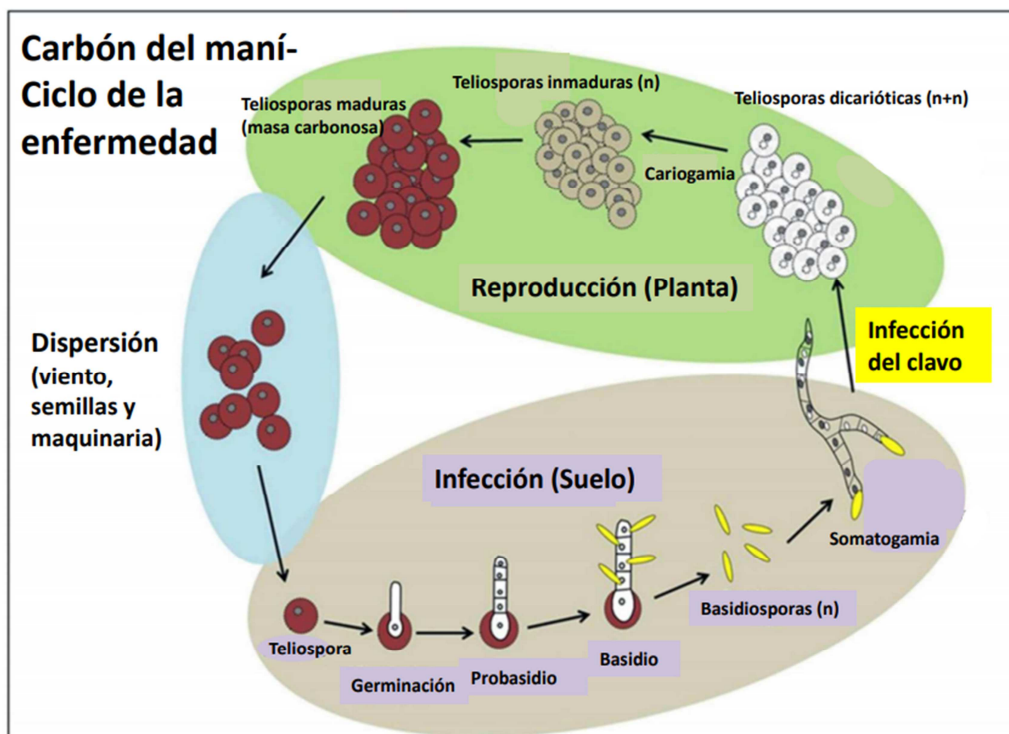


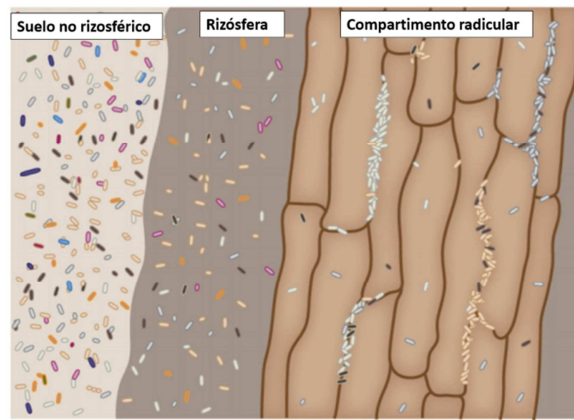
Figura 1: Ciclo de vida de *Thecaphora frezii*. Adaptado de Rago *et al.*, 2017.

Los síntomas son observados en los frutos (estadio R8) y se caracterizan por presentar hipertrofia y deformaciones en las vainas y semillas. En el interior de las vainas las semillas pueden presentar diferentes grados de severidad de esta enfermedad, que van desde pequeños soros (pequeña deformación o ampolla de color oscuro formada por

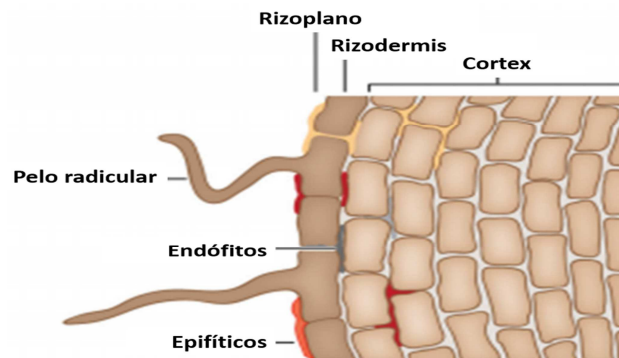
teliosporas del patógeno) en su superficie, o bien las semillas pueden estar afectadas parcial o totalmente con una masa carbonosa de esporas. La enfermedad comienza cuando los ginóforos (clavos) penetran en el suelo. Marinelli *et al.* (2008) sugieren que son los clavos los que liberan compuestos al medio que estimulan la germinación de las teliosporas, las cuales germinan sobre la superficie del tejido vegetal formando el probasidio. A continuación formará el basidio de donde se formarán las basidiosporas que darán origen a un micelio infectivo, luego de la somatogamia o fusión de los tubos germinativos haploides (Figura 1). Este micelio (2n) infecta a los clavos penetrando desde el exterior, atravesando las paredes del fruto para colonizar las semillas, donde incrementa notablemente la formación de hifas y se produce la esporulación que posteriormente dará lugar a la masa carbonosa de teliosporas maduras en detrimento de los granos (Marraro Acuña *et al.*, 2013; Astiz Gassó y Marinelli 2013; Rago *et al.*, 2017). Este patógeno puede sobrevivir en el suelo, y al mismo tiempo ser infectivo, por más de cuatro años formando teliosporas y la diseminación de esta enfermedad es causada por la dispersión de las mismas (Cazón *et al.*, 2016). Debido a que cuando finaliza la cosecha y las plantas son arrancadas para dejarse secar en el lote, las esporas provenientes de frutos que se rompen o desprenden ocasionan un gran aumento de la carga de inóculo del patógeno en el lote. Como así también las esporas provenientes de granos enfermos pueden quedar adheridas a las semillas asintomáticas, las cuales pueden ser introducidas por el productor en nuevas áreas del campo. Además, las esporas pueden ser diseminadas por el viento o viajar adheridas a las herramientas, o bien en la maquinaria agrícola (Marinelli *et al.*, 2010). En la actualidad, se intenta controlar esta enfermedad con búsquedas de cultivares resistentes, rotaciones de cultivos (aconsejando el maíz, previamente a la siembra de maní), uso de fungicidas químicos, sistemas de labranzas y llevando un registro y monitoreo de lotes con carbón (Marraro Acuña, 2014).

### **1.3. Microorganismos asociados a las plantas**

Las plantas son colonizadas por comunidades microbianas complejas que juegan diferentes roles en cuanto a su crecimiento y salud. Algunos de estos microorganismos son perjudiciales y causan enfermedades, mientras que otros promueven el crecimiento, aumentan la adquisición de nutrientes y la tolerancia tanto a estrés biótico como abiótico, a través de múltiples mecanismos (Brader *et al.*, 2017). Los ecosistemas microbianos deben ser considerados desde una perspectiva de sistemas, que consiste en todos los microorganismos que viven en una determinada región o nicho y están interactuando con factores bióticos (plantas y animales) y abióticos (temperatura, composición química y estructura del entorno) del nicho (Raes y Bork, 2008).



**Figura 2:** Representación de la sección longitudinal de una raíz mostrando las comunidades microbianas que habitan en la rizósfera circundante y el suelo no rizosférico. Adaptado a partir de Müller *et al.*, (2016).

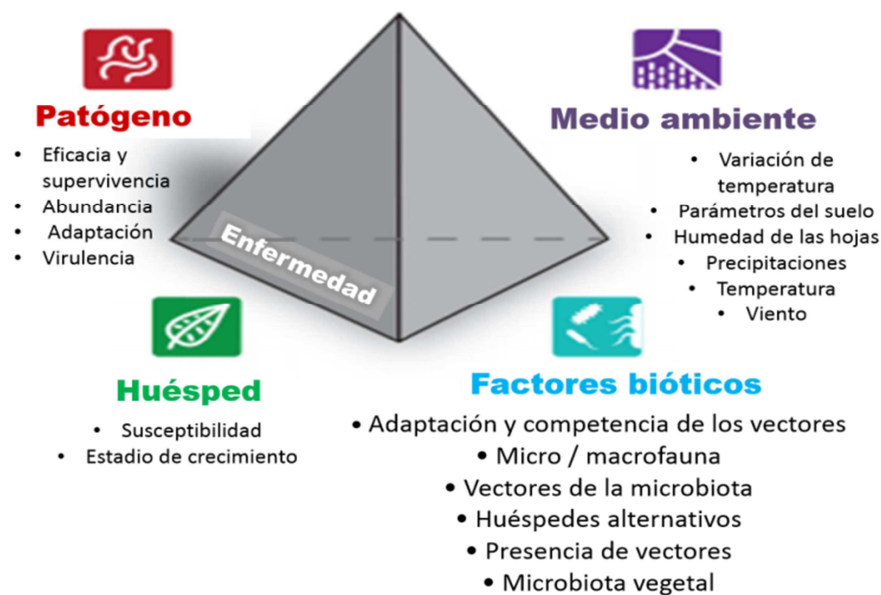


**Figura 3:** Representación de un corte transversal de una raíz mostrando la colonización radicular por microorganismos epifíticos y endófitos. Adaptado a partir de Müller *et al.*, (2016).

Una gran parte de la comunidad microbiana puede definirse como microorganismos comensales que encuentran su nicho en la asociación con las plantas pero que no tienen función conocida para sus huéspedes. Dependiendo de los diferentes ambientes vegetales, la microbiota asociada con las plantas puede encontrarse en el exterior de las plantas, como en la rizósfera o filósfera, o bien en el interior de las plantas o endosfera (Figura 2). El enorme grupo de microorganismos que viven como endófitos y epifitos (Figura 3), dentro y sobre las plantas (respectivamente), extiende el genoma del huésped, formando lo que se denomina hologenoma. Este es un término utilizado para describir un huésped individual y su comunidad microbiana, incluyendo virus, y considerando a todos como un super organismo (es decir, una unidad social integrada compuesta de conoespecíficos). Este concepto surge para explicar cómo los fenotipos del huésped son profundamente afectados de forma cooperativa y competitiva por las complejas comunidades microbianas (Theis *et al.*, 2016). La contribución de los microorganismos puede permitir la adaptación a condiciones ambientales nuevas o cambiantes, así como



la capacidad para hacer frente a la emergencia de patógenos, aspectos esenciales del estilo de vida sésil de las plantas (Müller *et al.*, 2016). Por lo tanto, y como ya es sabido, el microbioma desempeña un papel muy importante en la salud de las plantas y la supresión de patógenos (Berendsen *et al.*, 2012). En base a estas observaciones y considerando la complejidad natural de las interacciones bióticas, Brader *et al.* (2017) proponen un tetraedro de la enfermedad que contempla los factores bióticos como la cuarta dimensión para ilustrar la interacción entre diversos factores determinantes de la enfermedad (Figura 4). Estos factores adicionales incluyen vectores que transmiten patógenos y, especialmente, la microbiota que modula la patogénesis y los mecanismos de defensa de las plantas.



**Figura 4:** Tetraedro de la enfermedad de las plantas. De acuerdo con el tetraedro de la enfermedad, el desarrollo de una enfermedad de las plantas podría ser inhibido o modulado por un vector transmisor (animal), un huésped alterno (planta o animal) y otros microbios asociados a las plantas. Adaptado a partir de Brader *et al.*, (2017).

#### 1.4. Control biológico de patógenos (biocontrol)

El incremento en la población mundial está llevando a una demanda mayor de alimentos, por lo tanto se busca ampliar la productividad de las materias primas de la industria alimenticia. En perjuicio de esto, las enfermedades en los cultivos disminuyen

notablemente la producción y causan grandes pérdidas económicas. Los fungicidas de origen químicos son la principal herramienta para el control de las enfermedades, pero su uso ha ocasionado importantes consecuencias ecológicas, tanto para la salud humana, como para la microbiota nativa del suelo (Andrés *et al.*, 1998; Andrés *et al.*, 1999). Se estima que anualmente se utilizan alrededor de tres mil millones de kilogramos de pesticidas en todo el mundo (Pimentel, 2009). Por lo cual, el uso indiscriminado de sustancias químicas, como se mencionó anteriormente, conduce a problemas ambientales como son el desarrollo de cepas resistentes a los agentes químicos, acumulación de los residuos de los plaguicidas en el medio ambiente y eliminación de microorganismos beneficiosos y antagonistas naturales de plagas. Además, el alto costo de estos productos es un factor limitante en la rentabilidad de la producción de maní (Partidge *et al.*, 2006). Los productos químicos utilizados para controlar las plagas y enfermedades se depositan en los cultivos y las cosechas. Los informes de FAO-WHO (The Food and Agriculture Organization-Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés) y los datos proporcionados por la FDA (US Food and Drug Administration, Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos) indican que los contaminantes orgánicos persistentes están presentes en prácticamente todos los tipos de alimentos, incluidas las frutas, verduras, productos avícolas y lácteos (Schafer y Kegley, 2002).

En la actualidad se busca desarrollar una agricultura sustentable y no contaminante, y uno de los enfoques empleados para este fin es el biocontrol. Dentro de las áreas del biocontrol, una de las más estudiadas es la utilización de microorganismos antagonistas, tales como virus, bacterias, hongos y nematodos (Mehta *et al.*, 2014), para el control de fitopatógenos, sin perturbar el equilibrio ecológico (Velivelli Siva *et al.*, 2014). Las formulaciones de estos productos pueden ser aplicadas en el suelo en forma de suspensiones líquidas, sólidos (povos o gránulos) y a través de la aplicación por pulverización (Singh *et al.*, 2016). Los mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACBs) se basan en: la resistencia inducida y protección cruzada en cultivos, hipovirulencia, competencia, antibiosis y parasitismo. Adicionalmente, los ACBs presentan ventajas como puede ser la versatilidad de actuar contra más de un patógeno en diferentes cultivos y en la promoción de crecimiento del cultivo, inducir respuestas de defensa en la planta frente a ataques de patógenos, como así también frente a diferentes estreses ambientales, además de su uso en el mejoramiento y mantención de la productividad del suelo (Hermosa *et al.*, 2013). Por otra parte, la combinación de los ACBs con niveles reducidos de fungicidas (control integrado) brinda un grado de supresión de la enfermedad similar al conseguido con el tratamiento de fungicida solo (Monte, 2001). Por este motivo, en un futuro, el control integrado de plagas podría

contribuir a disminuir las aplicaciones de pesticidas sintéticos, como así también brindar mejores respuestas frente a plagas en relación a la aplicación de cada uno de manera individual.

### 1.4.1. *Trichoderma spp.* como agente de biocontrol

Los hongos del suelo del género *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*), pertenecientes a los ascomicetes, representan uno de los biofungicidas más utilizados en la agricultura actual, ya que más del 60% de productos registrados a nivel mundial son bioformulados a base de ellos (Verma *et al.*, 2007). Son hongos filamentosos, no patógenos, distribuidos ampliamente en todos los suelos del planeta y colonizadores de muchas raíces de las plantas como oportunistas, avirulentos y simbioses (Harman *et al.*, 2004). El éxito de cepas de *Trichoderma* como ACBs es debido a su alta capacidad reproductiva, su sobrevivencia en condiciones muy desfavorables, a la fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos, la eficiencia en la promoción del crecimiento vegetal y la inducción de los mecanismos de defensa de las plantas. Estas propiedades han permitido a este género estar presente en cualquier hábitat y en altas densidades de población (Chet *et al.*, 1997). Además, es conocido que *Trichoderma* controla hongos de la familia de los ascomicetes, los antiguamente llamados deuteromicetes y basidiomicetes, los cuales constituyen los principales patógenos aéreos y terrestres de los cultivos (Monte, 2001). El efecto de control de este ACB es más efectivo en un suelo ácido que alcalino (Benítez *et al.*, 2004). Dentro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* encontramos:

- **Competición:** Por medio de una rápida colonización y la captación de los nutrientes disponibles, estos microorganismos ocupan el nicho que de otra manera podría ser apropiado por un organismo patógeno (Rodríguez *et al.*, 2009). El motivo más común de la muerte de muchos microorganismos es debido a la inanición producida por las cepas de *Trichoderma* que crecen próximas a estos microorganismos, las cuales ocasionan escasez de nutrientes limitantes y colonización rizosférica. Los exudados radicales y la rizósfera son una fuente rica de nutrientes como, azúcares, aminoácidos, hierro, vitaminas, ácidos orgánicos, etc. (Singh *et al.*, 2018). Por lo tanto, aquellos microorganismos que tengan una gran capacidad para movilizar y absorber los nutrientes, como es el caso de *Trichoderma*, serán más eficientes y competitivos que muchos otros microbios del suelo para la colonización (Benítez *et al.*, 2004). Algunas cepas de *Trichoderma* utilizadas como ACBs producen sideróforos muy eficientes que pueden detener el

crecimiento de otros hongos (Chet e Inbar, 1994). Por ejemplo el ácido harziánico (HA, por sus siglas en inglés), que es un metabolito secundario producido por *Trichoderma*, presenta actividad antifúngica, es un promotor de crecimiento vegetal y estimula la germinación en semillas de tomate. Además, recientemente se ha demostrado su habilidad para unirse a metales, tales como el  $\text{Fe}^{3+}$ , lo cual puede representar un mecanismo de solubilización del hierro incrementando la disponibilidad del mismo para la planta como para otros microorganismos (Vinale *et al.*, 2013). Asimismo, el HA tiene la capacidad de incrementar la expresión de genes relacionados a la defensa cuando es aplicado en plantas de tomate (Manganiello *et al.*, 2018).

Sin embargo, el uso de la estrategia de competición para el biocontrol puede verse limitada frente a una elevada carga del inóculo del patógeno, por lo cual en esta circunstancia, su uso no sería muy efectivo (Latz *et al.*, 2018).

- **Antibiosis:** Este proceso se produce durante las interacciones de compuestos difusibles de bajo peso molecular, producidas por cepas de *Trichoderma*, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Los compuestos que producen estas cepas son volátiles y no volátiles e impiden la colonización de la rizósfera por parte de patógenos. Entre los metabolitos se encuentran el ácido harziánico, alometicina, tricolina, peptaiboles, 6 pentil- $\alpha$ -pirona (6 PP), masoilactona, viridina, gliovirina, ácido heptalídico, entre otros (Vey, 2001). Las estructuras químicas de los antibióticos producidos pueden sugerir dos posibles mecanismos de acción diferentes. Por un lado, la producción de compuestos volátiles, apolares y de bajo peso molecular, por ejemplo 6 PP, presentan una alta concentración en el suelo y poseen un radio de acción relativamente grande dentro de las comunidades microbianas. Por otro lado, se encuentran aquellos que poseen un efecto a corta distancia, que actúan en la proximidad de las hifas productoras, y dentro de este grupo se encuentran los antibióticos polares y peptaiboles (Vinale *et al.*, 2008).

La combinación de la actividad de enzimas hidrolíticas con antibiosis produce un alto nivel de antagonismo frente a patógenos, comparado a cada uno de estos dos mecanismos de forma aislada (Howell, 1998; Monte, 2001). Este efecto sinérgico fue observado en la inhibición de la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* utilizando una combinación de una endoquitinasa (*Trichoderma harzianum*) y gliotoxina, también el mismo efecto se obtuvo con enzimas hidrolíticas y peptaiboles (Howell, 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que los peptaiboles inhiben la actividad de la  $\beta$ -glucano sintasa en el hongo huésped, mientras que actuaban de manera sinérgica con la  $\beta$ -glucanasa producida por *T. harzianum*. La inhibición de la enzima del patógeno huésped impide la

reconstrucción de su pared celular, facilitando así la acción disruptiva de las  $\beta$ -glucanasas; de este modo la acción combinada aumenta la actividad fungicida (Lorito *et al.*, 1996). Las enzimas hidrolíticas son necesarias para una degradación de la pared de los patógenos y de este modo facilitar el biocontrol (Howell, 2003). También, aplicaciones exógenas de peptaiboles inducen una respuesta de defensa en plantas de tabaco y reducen la susceptibilidad de las mismas frente al virus del mosaico del tabaco (Wiest *et al.*, 2002).

- **Micoparasitismo:** Es un proceso en el cual se produce el ataque directo de un hongo frente a otro; se desarrolla de forma compleja ya que involucra eventos secuenciales de reconocimiento, ataque, con subsecuente penetración y muerte del huésped. La interacción micoparasítica es programada, aparentemente, por señales del huésped (Viterbo y Horwitz, 2010), lo que resulta en la formación de estructuras infecciosas y en la secreción de enzimas (Mukherjee *et al.*, 2013). La producción de quitinasas, glucanasas y proteasas facilita el flujo de nutrientes hacia el micoparásito y la degradación del huésped (Mukherjee *et al.*, 2013). Se planteó la hipótesis que las cepas secretan constitutivamente exoquitinasas a bajos niveles y cuando estas enzimas degradan la pared de los hongos se liberan oligómeros que inducen una mayor producción de exoquitinasas, comenzando así el ataque (Benítez *et al.*, 2004).

El micoparasitismo se inicia por la formación de estructuras similares a apresorios y *Trichoderma* comienza a enrollarse en la hifa del huésped. Los genes responsables de la fijación del hongo micoparasítico aún no han sido identificados, pero posiblemente las hidrofobinas podrían estar involucradas en este proceso (Druzhinina *et al.*, 2011). Esto es debido a que mutantes deficientes en la expresión de hidrofobinas fueron defectuosas para la hidrofobicidad y micoparasitismo (Mukherjee y Kenerley, 2010). Luego, *Trichoderma* secreta un complejo conjunto de enzimas degradadoras de pared y membrana celular conocidas como CWDEs (cell-wall degrading enzymes). Los genes que codifican para estas enzimas están relacionados al micoparasitismo y responden transcripcionalmente a la presencia del hongo blanco (Carsolio *et al.*, 1994; Geremia *et al.*, 1993; Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998). Los productos de los genes relacionados al micoparasitismo, que conforman el complejo CWDEs, actúan sinérgicamente con los metabolitos secundarios y ambos son determinantes en la capacidad antagónica de *Trichoderma* (Schirmböck *et al.*, 1994). Dentro de los genes relacionados al micoparasitismo se encuentran en su mayoría quitinasas, glucanasas y proteasas; además se observó que en el genoma de tres especies de *Trichoderma* se encuentran un gran número de

genes que codifican para CWDEs, como así también para rutas biosintéticas de metabolitos secundarios. Esto le confiere a este género una gran ventaja a la hora de establecer una relación antagónica o defenderse de otros hongos (Kubicek *et al.*, 2011). Los genes que se creían importantes en el micoparasitismo son los de las quitinasas; sin embargo, cuando se suprimieron algunos de estos genes no se produjeron grandes efectos en el mencionado mecanismo, esto puede deberse a que las cepas de *Trichoderma* presentan un alto número de copias de ellos en sus genomas (Druzhinina *et al.*, 2011). Por otro lado la expresión del gen *chit42*, procedente de un hongo entomopatógeno, en una cepa de *T. harzianum* aumentó su capacidad biocontroladora frente al patógeno *B. cinerea* (Xia *et al.*, 2018). Las glucanasas son otras enzimas importantes involucradas en el proceso de biocontrol por parasitismo. En estudios realizados, en donde, por un lado, se suprimió y por el otro se sobreexpresó el gen *tvbng3* (codifica una  $\beta$ -1-6-glucanasa), se redujo e incrementó el potencial micoparasítico de *Trichoderma virens* contra *Pythium ultimum*, respectivamente (Djonović *et al.*, 2006a). Además, la sobreexpresión de dos  $\beta$ -glucanasas (TvBng2 y TvBng3) resultaron en una mejora del efecto biocontrolador de *T. virens* contra *Rhizoctonia solani*, *P. ultimum* y *Rhizopus oryzae* (Djonović *et al.*, 2007). Otras de las enzimas muy importantes son las proteasas PRB1/Sp1 que son inducidas durante el micoparasitismo y tienen un rol significativo en el control biológico (Viterbo y Horwitz, 2010). Por último, *Trichoderma* no solo parasita a las hifas activas, sino que también, a las estructuras como esclerocios y peritecios (Inch y Gilbert 2011; Mukherjee *et al.*, 1995). Se conoce que las lacasas producidas por *T. virens* participan en la colonización de estructuras de esclerocios (Catalano *et al.* 2011).

- **Inducción de sistemas de defensa en plantas:** La inducción de la defensa en la planta por *Trichoderma* suele ser mediante un mecanismo de resistencia sistémica inducida (ISR, utilizada contra patógenos necrotróficos) o de resistencia sistémica adquirida (SAR, que suele ser desencadenada por patógenos biotróficos y hemibiotróficos). También, puede existir un mecanismo que incluye ambas vías, probablemente debido a la capacidad de los miembros del género para crecer sobre o dentro de las raíces (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2017). Además, el estado de resistencia parece ser heredado a la progenie, ya que en uno de los últimos hallazgos, se demostró que la progenie de plantas de tomate que habían sido tratadas con *Trichoderma* heredaban un estado de resistencia que le confería protección contra nemátodos (Medeiros *et al.*, 2017).

La primera línea activa de defensa es conocida como la inmunidad innata de las plantas. La defensa basal, para limitar el ataque creciente, se inicia en la parte

externa de las células del huésped donde moléculas microbianas conservadas (componentes principales de la pared celular fúngica, tales como  $\beta$ -glucanos y quitina) denominados patrones moleculares asociados a microbios o patógenos (MAMPs y PAMPs, respectivamente, por sus siglas en inglés) son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), localizados en la membrana plasmática de las células de las plantas (Boller y Felix, 2009). Estos receptores están subdivididos en dos grupos principales, por un lado receptor quinasas con capacidad de reconocer estreses abióticos y por el otro, las proteínas tipo receptor que son menos abundantes (Dodds y Rathjen, 2010). De la misma manera, los PRR responden a oligómeros de pared o fragmentos cuticulares de la propia pared celular vegetal, liberados por la acción hidrolítica fúngica en los tejidos de la planta, los cuales se conocen como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs por sus siglas en inglés). La estimulación de los PRRs da lugar a una cascada de transducción y la activación de la inmunidad desencadenada por MAMPs o PAMPs (MTI o PTI respectivamente, por sus siglas en inglés). Este proceso conduce a la fortificación de la pared celular (síntesis de callosa y lignina), la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos (fitoalexinas), la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (quitinasas y glucanasas) y fitohormonas como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Estas hormonas son moléculas centrales en la defensa y su señal se transmite sistémicamente a través de las células vecinas (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2017). La cantidad, composición y el tiempo de la mezcla fitohormonal producida por la planta varían dependiendo de la especie vegetal, como así también, en gran medida por el estilo de vida y estrategia de infección del atacante invasor (Pieterse *et al.*, 2009). Para el caso de *Trichoderma*, este es un fenómeno dependiente de la cepa, de la concentración de la misma y del tiempo (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2017).

Los patógenos o invasores pueden suprimir las respuestas PTI o MTI, respectivamente, de las plantas liberando una gran cantidad de moléculas pequeñas (proteínas Avr, coronatinas, giberelinas, etc) que se denominan efectores, permitiendo la infección o colonización endofítica, respectivamente. Este mecanismo completo se denomina ETS (por sus siglas en inglés) o susceptibilidad inducida por efectores (Jones y Dangl, 2006). Las plantas pueden sensor los efectores por medio de receptores citosólicos, siendo los más abundantes una clase de receptores polimórficos intracelulares que contienen dominios de unión a nucleótidos (NBS) y dominios ricos en leucinas (LRR). Los efectores de los patógenos o invasores son reconocidos por los receptores NBS-

LRR (Stergiopoulos y De Wit, 2009) y activan diferentes rutas de transducción de señales, dependiendo del organismo que interacciona con la planta (Hermosa *et al.*, 2013). La plasticidad de los receptores se debe a que los genes de estas proteínas presentan una alta tasa de mutación y a regiones metiladas diferencialmente, por lo menos en el genoma de *Arabidopsis* (Schmitz *et al.*, 2013). Además, se plantea que un control epigenético podría limitar su expresión hasta la liberación del silenciamiento por el ataque del patógeno. El reconocimiento de los efectores por los receptores citosólicos induce el mecanismo de inmunidad inducida por efectores (ETI) que es efectiva contra los patógenos biotrofos y hemibiotrofos, pero no es efectivo contra los patógenos necrotróficos (Hermosa *et al.*, 2013). La ETI, es una respuesta cualitativamente más fuerte y rápida que las MTI/PTI (Hermosa *et al.*, 2013), y además se asocia frecuentemente con el desarrollo de un estallido oxidativo temprano y la respuesta hipersensible (HR), que es una forma de muerte celular programada localizada en el sitio de la infección y evita la propagación del patógeno dentro de la planta (Mur *et al.*, 2008). Lo mencionado anteriormente explica la comunicación que *Trichoderma* establece con la planta, liberando DAMPs, una variedad de MAMPs y efectores que luego de ser reconocidos por los receptores NBS-LRR son capaces de inducir diferentes tipos de respuestas beneficiosas en plantas de tabaco (Rotblat *et al.*, 2002), melón (Martínez *et al.*, 2001), algodón (Djonović *et al.*, 2006b), maíz (Gaderer *et al.*, 2015), soja (Zhang *et al.*, 2016), pepino (Brotman *et al.*, 2008), vid (Perazzolli *et al.*, 2011) y tomate (Cai *et al.*, 2013; Ruocco *et al.*, 2015) sin ser reconocido como amenaza.

Por último, una de las características comunes de las respuestas de resistencia inducida por microbios beneficiosos es el efecto “priming” con el cual las plantas responden con mayor rapidez y fuerza frente al ataque posterior de un patógeno (Conrath, 2011). Este sistema no incurre en la expresión de una costosa respuesta de defensa, debido a que la activación de los mecanismos de defensa se dan luego del reconocimiento de un potencial intruso (Zamioudis y Pieterse, 2012). Este mecanismo de defensa podría ser disparado por la acción de las citoquinas sintetizadas por los microorganismos benéficos, ya que se demostró que con la aplicación de citoquinas solo se activan las defensas con la infección del patógeno (Albrecht y Argueso, 2016). Además, sería una solución frente al dilema que se plantea entre la protección de la enfermedad y los costos asociados en la activación de la defensa (Hermosa *et al.*, 2013).



## 1.5. *Trichoderma* como promotor del crecimiento vegetal

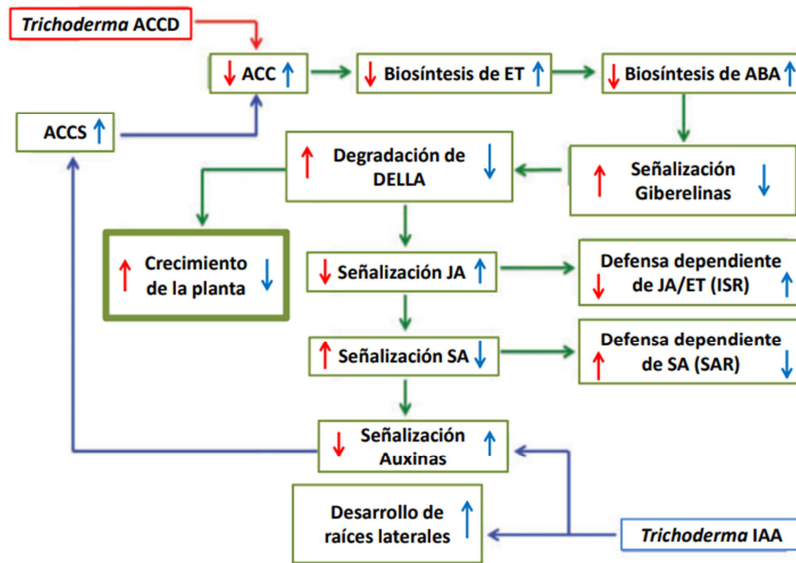
Dentro del género *Trichoderma*, algunas cepas presentan efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas y mejoran la resistencia a estreses bióticos y abióticos. Los primeros trabajos en donde se observó que *Trichoderma* promueve el crecimiento vegetal fueron realizados por Baker *et al.*, 1984 y Chang *et al.*, 1986, en plantas de rábano, pimienta, pepino y tomate. Además, se demostró que *Trichoderma* también aumenta el desarrollo de la raíz, el rendimiento de los cultivos, la proliferación de raíces secundarias, el peso fresco de plántulas y el área foliar (Harman, 2000). La eficacia de *Trichoderma* spp. como biofertilizante ha sido demostrada en numerosos trabajos, indicando que cuando se aplica en el suelo, semillas o superficies de plantas, incrementa la solubilidad de nutrientes, como así también, la capacidad de absorción de las raíces. Los efectos beneficiosos de *Trichoderma* en plantas pueden ser explicados por la capacidad del hongo en modular la arquitectura, y a través de la producción de compuestos que incrementan la disponibilidad de nutrientes, como sideróforos y ácidos orgánicos (López-Bucio *et al.*, 2015). La cepa T-203, recientemente identificada como *Trichoderma asperelloides* (López-Bucio *et al.*, 2015), aumentó en un 90 y 30% la concentración de P y Fe en las raíces de plantas de pepino, respectivamente. También, luego de 5 días posteriores a la inoculación, se registró un aumento en la producción de biomasa radicular y en el tallo, acompañado de un incremento en las concentraciones radiculares de Cu, P, Fe, Zn, Mn y Na (Yedidia *et al.*, 2001). En otro estudio, Azarmi *et al.* (2011) demostraron que con la inoculación de una cepa de *T. harzianum* incrementaban las concentraciones de Ca, Mg, P y K en los tallos y raíces de plántulas de tomate. Además, observaron un incremento en el número y área foliar, del mismo modo que un aumento en el contenido de clorofila. Igualmente, observaron incrementos en parámetros de crecimiento como la altura, el diámetro, peso fresco y seco del tallo, del mismo modo para el peso fresco y secos de las raíces.

La actividad promotora del crecimiento ejercida por *Trichoderma atroviride* en plántulas de tomate está asociada a la reducción en la producción de etileno (ET), como resultante de una disminución de su precursor el ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a través de una ACC desaminasa (ACCD) presente en *Trichoderma* (Gravel *et al.*, 2007). En genomas de *Trichoderma* se han encontrado secuencias de ACCD (Kubicek *et al.*, 2011) y en estudios de silenciamiento génico (ARNi) del gen de la ACCD de *Trichoderma asperellum* las mutantes presentan una disminución en la promoción del crecimiento de las raíces (comparado con las cepas salvajes) en plantas de canola. Por lo cual, la ACCD

de *Trichoderma* tiene un rol importante en la promoción de crecimiento radicular (Viterbo *et al.* 2010).

La inmunidad y el desarrollo de la planta están interrelacionados en una red de vías de señalización hormonal (Pieterse *et al.* 2009). Existe una comunicación cruzada entre ácido salicílico (SA), jasmónico (JA) y etileno (ET) (principales hormonas implicadas en respuesta de defensa) y las vías de respuesta de otras hormonas tales como el ácido abscísico (asociado al desarrollo de la planta y el estrés abiótico), ácido indolacético (IAA, relacionado al crecimiento de la planta y al desarrollo de raíces laterales) y giberelinas (controlan el crecimiento de las plantas regulando la degradación de las proteínas represoras del crecimiento llamadas DELLA). En *Trichoderma* la actividad ACCD disminuye la disponibilidad de ACC necesario para la biosíntesis de ET (Figura 5). La disminución de ET promueve el crecimiento por medio de las giberelinas que ocasionan un aumento de la degradación de las proteínas DELLA. Por otro lado, las giberelinas pueden controlar la biosíntesis de JA y respuestas de defensa dependientes de SA en la planta, a través de la regulación de la degradación de las proteínas DELLA. Las hormonas ET y IAA en las raíces pueden regular, recíprocamente, la biosíntesis de cada uno de ellos (Stepanova *et al.*, 2007) y de acuerdo con esta observación el IAA de *Trichoderma* contribuye a la biosíntesis de ET por la ACC sintasa, la cual a su vez, provoca un aumento en la síntesis de ácido abscísico. Dependiendo del tiempo y el resultado de los estímulos de *Trichoderma*, la homeostasis de fitohormonas controlará el desarrollo de la planta y la respuesta inmune (Hermosa *et al.*, 2012).

Por otro lado, *Trichoderma* también produce auxinas que son capaces de estimular el crecimiento de las plantas y el desarrollo de la raíz (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Se ha observado un efecto de estimulación de crecimiento por auxinas en plantas de arvejas tratadas con harzianolida y 6-pentil- $\alpha$ -pirona que son los principales metabolitos secundarios producidos por las cepas de *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008). Otro efecto importante, asociado a *Trichoderma*, es que la colonización rizosférica por parte de *Trichoderma virens* produce una mayor inducción de tasas fotosintéticas e incrementos sistémicos en la captación de CO<sub>2</sub> en hojas de plantas de maíz (Vargas *et al.*, 2009).



**Figura 5:** Modelo de comunicación entre la planta y *Trichoderma*. Los efectos de la ACC deaminasa (ACCD) y la producción de ácido indolacético (IAA) por *Trichoderma* están indicados con flechas rojas y azules, respectivamente. Las flechas hacia arriba o hacia abajo indican un aumento o disminución de los niveles de respuesta. ABA, ácido abscísico; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; ACCS, ACC sintasas; ET, etileno; ISR, Resistencia Sistémica Inducida; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; SAR, Resistencia Sistémica Adquirida. Adaptado de Hermosa *et al.*, 2012.

En trabajos realizados por Donoso *et al.* (2008) y Bae *et al.* (2009) se encontró que *Trichoderma* tenía efectos beneficiosos sobre plantas sometidas a estrés abiótico, aunque los mecanismos que controlan los factores de estrés aún son desconocidos. Otro efecto importante fue descubierto por Mastouri *et al.* (2010) quienes demostraron que semillas de tomates tratadas con *T. harzianum* presentan una aceleración de la germinación, un aumento de vigor de las plántulas, además atenúa efectos de estreses hídricos, osmóticos, salinos y térmicos. Un mecanismo por el cual los hongos beneficiosos y las bacterias PGPR pueden mejorar la tolerancia a estos estreses abióticos podría ser por la atenuación de los daños producidos por las especies reactivas del oxígeno (ROS) en las plantas estresadas (Mastouri *et al.*, 2010).

Recientemente en una revisión realizada por Guzmán-Guzmán *et al.* (2018) encontraron, en el genoma de *T. atroviride*, secuencias que presentaban homologías con otros géneros fúngicos, bacterias y *Arabidopsis thaliana* para genes relacionados con la biosíntesis y señalamiento de fitohormonas. Las fitohormonas producidas por hongos han demostrado jugar roles importantes en las interacciones patogénicas entre hongos y plantas. En las interacciones entre plantas y hongos benéficos, por medio de fitohormonas, aún no se conoce demasiado. Entre los genes encontrados, están los

relacionados a la biosíntesis de auxinas. Las auxinas son un grupo de compuestos derivados del indol, con los cuales las plantas regulan la división celular, elongación e iniciación de la raíz, entre otros roles biológicos. El rol de las auxinas fúngicas en la regulación de la arquitectura radicular sigue en debate, ya que hay evidencia que compuestos orgánicos volátiles producidos por algunas cepas de *Trichoderma* (como por ejemplo 6-PP) provocan cambios en la arquitectura e incrementan la biomasa a través de un señalamiento de auxinas en *Arabidopsis* (Garnica-Vergara *et al.*, 2016). El hecho de que se hayan encontrado genes involucrados en la biosíntesis y señalamiento de auxinas en el genoma de *T. atroviride* sugiere que este microorganismo no solo sería capaz de producir auxinas sino que además podría percibir las producidas por las plantas. Además, se encontraron genes relacionados con la producción de citoquinas (CKs), que son hormonas involucradas en la diferenciación celular de las plantas, ramificaciones de raíces y tallos, tolerancia a estrés y balance de nutrientes. Son importantes para establecer interacciones plantas-microorganismos, como en la activación de la defensa en la planta. La investigación sugiere que *Trichoderma* es capaz de sintetizar CKs y junto a la combinación de otras fitohormonas, el hongo podría promover el crecimiento vegetal. Las CKs participan en la ramificación de hifas, como así también en la comunicación con la planta. También se encontraron genes relacionados con la biosíntesis de giberelinas (GAs), que son fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal. Las GAs, como metabolitos secundarios, no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo fúngico. Si bien, los investigadores reportaron haber encontrado genes relacionados a enzimas de la biosíntesis de GAs, en el genoma de *T. atroviride*, no encontraron las enzimas claves de la vía de síntesis. Por lo tanto, concluyen que *Trichoderma* no podría producir GAs. Adicionalmente, también encontraron genes relacionados al etileno, que es una hormona vegetal gaseosa con roles en la germinación de semillas, maduración de frutas y senescencia de la planta. El etileno no solo afecta directamente la fisiología de la planta sino que además está relacionado con el estrés nutricional. Cuando la planta está sujeta a una limitación de nutrientes hay un incremento en la cantidad de etileno, el cual resulta en un aumento en la sensibilidad para auxinas y a la percepción de etileno, llevando a una tolerancia frente al estrés. La presencia de genes relacionados a la biosíntesis de etileno en el genoma de *T. atroviride* sugiere que la producción de estas moléculas, por el hongo, podría estar implicada en la inducción de tolerancia en la planta a varios tipos de estreses. Por último, se encontraron genes relacionados con el ácido abscísico (ABA), el cual es una hormona que controla la latencia y desarrollo de las semillas, apertura estomática y promueve la tolerancia a estreses abióticos, como sequía y alta salinidad en plantas. Los autores Guzmán-Guzmán *et al.* (2018) concluyeron que *T. atroviride* no puede producir una molécula activa de ABA pero puede producir sus precursores

inmediatos. Estos, podrían ser suministrados a la planta durante la interacción, donde podrían ser transformados en ABA por las enzimas de la propia planta. Algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de modular la transpiración de hojas y apertura de estomas en *Arabidopsis*, induciendo un receptor de ABA. Los precursores de ABA derivados de *Trichoderma* podrían participar regulando la apertura de estomas, aumentando la tolerancia a estrés en la planta. Este podría representar otro mecanismo, por el cual, *Trichoderma* ayudaría a la planta a contrarrestar los efectos de estreses ambientales.

### 1.6. *Trichoderma* como endófito

Las plantas pueden ser colonizadas por microorganismos endófitos patógenos y no patógenos, que pasan al menos una parte de su ciclo de vida dentro de las plantas. De este modo la definición de microorganismos endófitos afirma que el término "endófito" debe referirse sólo al hábitat, no a la función. Por lo tanto, el término debería ser más general e incluir a todos los microorganismos que, durante parte o todo su ciclo de vida, colonizan los tejidos internos de las plantas (Hardoim *et al.*, 2015). Este tipo de sinergismo mutualista puede haber comenzado a evolucionar desde el momento en que las plantas superiores aparecieron en la tierra. Se han descubierto microbios asociados a plantas a partir de tejidos fosilizados de tallo y hojas; por lo tanto, es posible suponer que algunos microbios endófitos puedan haber ideado sistemas que permitan la transferencia de información entre ellos y las plantas, y viceversa. Esta asociación permitiría un método más rápido y efectivo para que ambos se enfrenten a los cambios en las condiciones ambientales, y al hacerlo, desarrollen mecanismos de comunicación y compatibilidad entre ellos. De hecho, los microorganismos asociados a las plantas han desarrollado la capacidad de producir fitohormonas, lo cual permite que los microbios endófitos se adapten mejor al huésped, pudiendo contribuir a la relación, desempeñando funciones en la protección frente a patógenos, insectos y/o animales de pastoreo (Kharwar *et al.*, 2009).

Los microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal y proporcionar protección contra las infecciones deben ser capaces de colonizar las raíces de las plantas. La colonización implica una capacidad para reconocer y adherirse a las raíces, penetrar en la planta y tolerar metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión (Hermosa *et al.*, 2012). Se han identificado que algunas especies de *Trichoderma* son capaces de actuar como simbiontes endófitos de plantas. Las cepas se vuelven endófitas en las raíces, aunque producen los mayores efectos o cambios en la expresión génica en los tallos. Estos cambios alteran la fisiología vegetal y pueden dar

como resultado la mejora de la resistencia al estrés abiótico, en la absorción de fertilizantes nitrogenados, la resistencia a patógenos y la eficiencia fotosintética. Como resultado de esta interacción, normalmente, se obtienen efectos de aumento en el crecimiento y la productividad de las plantas (Harman *et al.*, 2012; Hermosa *et al.*, 2012). En *Trichoderma*, la adherencia a la superficie de la raíz puede estar mediada por hidrofobinas, las cuales son una familia de pequeñas proteínas hidrófobas ubicuas en hongos filamentosos. Están localizadas sobre todo en la superficie externa de las paredes celulares y están implicadas en el contacto célula-célula o de la superficie de la célula. La hidrofobina de clase I TasHyd1 está implicada en la colonización de la raíz de planta por parte de *Trichoderma asperellum*, la cual podría actuar protegiendo las hifas en crecimiento de compuestos de defensa de planta sintetizados localmente durante las primeras etapas de interacción, y esto le permitiría al hongo colonizar los espacios intercelulares de la raíz de la planta (Viterbo y Chet, 2006). La proteína Qid74 de *T. harzianum* actúa de una manera similar que TasHyd1 aunque no podría considerarse como una hidrofobina (Samolski *et al.*, 2012). Otra proteína que mejoró notablemente la capacidad de *T. asperellum* de colonizar las raíces de pepino es TasSwo, que es una proteína del tipo expansina con un dominio de unión a la celulosa (Brotman *et al.*, 2008). La enzima endopoligalacturonasa ThPG1 de *T. harzianum*, degradadora de la pared celular de las plantas, es requerida para una eficiente colonización de las raíces por parte del hongo (Morán-Diez *et al.*, 2009). Las raíces de pepino responden a la colonización de *T. harzianum*, que solo coloniza entre las células epidérmicas y corticales, mediante el enriquecimiento de calosa en el interior de la pared celular de la planta y esto impediría que *Trichoderma* se extienda hacia el cilindro vascular (Yedidia *et al.*, 1999). En relación con esto, en las etapas tempranas de la colonización de la raíz por parte de *Trichoderma*, el ácido salicílico tiene un papel clave, ya que es necesario para que el microorganismo quede restringido en el espacio apoplástico de la epidermis y corteza, impidiendo el acceso a los tejidos vasculares (Alonso-Ramirez *et al.*, 2014). La aplicación de una cepa de *T. harzianum* provocó biodegradación de ácidos fenólicos producidos por las plantas aliviando un estrés autotóxico, observando este efecto en siembras continuas del cultivo (Chen *et al.*, 2011). Además se informó que *Trichoderma koningii* reprime la producción de fitoalexinas a nivel transcripcional en plantas de *Lotus japonicus* (Masunaka *et al.*, 2011). La colonización por parte de una cepa de *Trichoderma hamatum*, en plántulas de cacao, no solo mejoró su crecimiento sino que además contribuyó a que las plantas toleren mejor la sequía (Bae *et al.*, 2009). También, cepas endófitas de *Trichoderma* demostraron capacidad de controlar al patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de guindilla (Bae *et al.*, 2011).

## 1.7. Suelo

### 1.7.1. Generalidades

El suelo es la delgada capa superficial que recubre el planeta tierra y actúa como interfase entre la atmósfera y la litósfera. Está compuesto por cinco componentes que son: minerales, materia orgánica, organismos vivos, gases y agua. Los minerales están divididos en tres tipos: arenas, arcillas y limos. Los porcentajes de estos tres componentes definen la textura del suelo. Además estos minerales, en especial las arcillas, son consideradas como partículas químicamente reactivas con iones, agua y otras sustancias. Por este motivo, las arcillas son a menudo las partículas más activas porque tienen características químicas únicas y presentan la mayor área superficial para reaccionar, resultando ser puntos importantes para las reacciones químicas. Por otro lado, la materia orgánica del suelo está formada por restos vegetales, animales y residuos microbianos en diferentes estados de descomposición que constituyen elementos fundamentales; de hecho el porcentaje de materia orgánica del suelo es uno de los mejores indicadores de la calidad agrícola (Needelman, 2013).

Los suelos proporcionan funciones vitales para la sociedad (Blum, 2006). En ellos se sostienen y respaldan nuestros ecosistemas terrestres, se cultivan nuestros alimentos, fibras, madera, además regula la atmósfera, filtra el agua, recicla los residuos, preserva nuestro patrimonio, actúa como recurso estético y cultural, proporciona una reserva de recursos biológicos y genéticos vitales ya que muchos de los antibióticos utilizados fueron encontrados en el suelo (D'Costa *et al.*, 2006). A pesar de su papel como motor biogeoquímico y como sistema de soporte de la vida en la Tierra, es dificultosa o insuficiente la atención de los políticos y de la sociedad en su conjunto (Bouma, 2001), especialmente en relación a temas como la protección y la sustentabilidad (Robinson *et al.*, 2012).

El suelo representa un entorno altamente heterogéneo para el microbioma que habita en él. Los diferentes componentes de las fracciones sólidas en el suelo (arena, limo, arcilla y materia orgánica) proporcionan una gran cantidad de diferentes microhábitats (van Elsas y Trevors, 1997). Los organismos residentes del suelo están expuestos a diferentes condiciones abióticas y nutricionales, las cuales constituyen diversas biosferas, y las mismas pueden variar incluso por encima de la escala del micrómetro. En un sistema “estable” se podría plantear la hipótesis de que cada microhábitat está ocupado por los organismos que son capaces de colonizar y establecerse. Estos organismos son colectivamente los catalizadores de los procesos bioquímicos del suelo. Los procesos

microbianos del suelo incluidos los que resultan en una supresión de enfermedades, son llevados a escala de microhábitats y biosferas del organismo. Estos procesos son susceptibles a los cambios principales que suceden en sus inmediaciones, por lo tanto los efectos cuantificables serán el resultado de los cambios individuales en la escala micrométrica (Garbeva *et al.*, 2004).

### 1.7.2. Procesos biogeoquímicos

El carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, calcio y hierro son los principales componentes químicos que los organismos vivos utilizan para formar moléculas estructurales, para la replicación y actividades de generación de energía. Estos mismos elementos son también, componentes importantes de los océanos, de la atmósfera y de la corteza terrestre. La fisiología de los organismos vivos se combina con la química, física y las fuerzas geológicas para redistribuir estos elementos entre reservorios bióticos y abióticos en procesos conocidos como ciclos biogeoquímicos. La palabra biogeoquímica implica contribuciones por separado de la biología, química y la geología. Sin embargo, estos aspectos no pueden y no deben considerarse de manera aislada. Es necesario una apreciación precisa de la interacción entre la geosfera y la biosfera para entender la compleja dependencia de los mundos físicos y biológicos, para así apreciar la gran importancia de la vida microbiana (Summons, 1993).

Los principales ciclos biogeoquímicos están relacionados y utilizan, en última instancia, la energía proveniente del sol a través de la fijación fotosintética del carbono. Las transformaciones dentro de cada ciclo biogeoquímico son reacciones de oxidación-reducción y cada una proporciona una base para la conexión entre los ciclos. Por ejemplo, en el ciclo del carbono, los reservorios inorgánicos constan de carbono en estado oxidado como  $\text{CO}_2$  en la atmósfera y disuelto en agua como  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , éstos están disueltos en los océanos y formando parte de los minerales de los sedimentos. Los reservorios orgánicos incluyen el carbono en un estado reducido, principalmente formando parte de la biomasa viva y materia orgánica muerta. En el proceso de fotosíntesis el  $\text{CO}_2$  se reduce para formar hidratos de carbono, oxidando  $\text{H}_2\text{O}$  y generando  $\text{O}_2$ . Este  $\text{O}_2$  está disponible para procesos respiratorios aeróbicos. Por lo tanto, el mantenimiento de una concentración de oxígeno del 21% requiere de ciclos rápidos de conversión de carbono. El proceso de respiración aeróbica es el medio más eficiente y significativo para la mineralización de la materia orgánica. Los organismos encargados de la fijación de carbono, también requieren de un suministro continuo de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, formando un vínculo entre los ciclos de estos



elementos. El ciclo del nitrógeno, al igual que el ciclo del carbono, implica un rápido reciclaje de los reservorios de nitrógeno asociados a la materia orgánica y a compuestos de nitrógeno inorgánicos disponibles tales como amoníaco, nitrito y nitrato. Los reservorios de nitrógeno se completan con el  $N_2$  atmosférico y los compuestos nitrogenados de los sedimentos. Estos reservorios están relacionados por procesos de oxidación biológica del amoníaco a nitrato (nitrificación), por la reducción de nitrato a  $N_2$  (denitrificación) y por la acción de microorganismos fijadores de nitrógeno que convierten el  $N_2$  atmosférico en amoníaco (fijación de nitrógeno). La capacidad para la fijación biológica del nitrógeno es una característica de muchos taxones y es probablemente, más importante en cianobacterias, bacterias fotótrofas y las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (Summons, 1993).

### **1.8. Diversidad microbiana del suelo**

Los microorganismos del suelo comprenden la mayor parte de la diversidad del planeta y tienen un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos, así como en el funcionamiento del ecosistema (Green *et al.*, 2004). La diversidad microbiana en los ecosistemas del suelo es enorme, y se estima que un gramo de suelo puede albergar hasta 10 mil millones de microorganismos de miles de especies diferentes (Torsvik y Øvreås, 2002). Debido a que los microorganismos del suelo juegan un papel central en la descomposición de la materia orgánica, como así también en la liberación de nutrientes minerales, están participando en el ciclo de nutrientes, regulando el contenido de los mismos, sus propiedades fisicoquímicas y en consecuencia la productividad primaria (Rutigliano *et al.*, 2004). Por otra parte muchas de las actividades antropogénicas, tales como, el desarrollo urbano, la agricultura, la contaminación y el uso de los pesticidas pueden afectar potencialmente la diversidad microbiana del suelo (Zhang *et al.*, 2004). Por lo tanto, y de acuerdo a todo lo expresado anteriormente, la diversidad microbiana del suelo es fundamental para el mantenimiento de la gestión ambiental y para la evaluación de la calidad del suelo (Liu *et al.*, 2006).

#### **1.8.1. Estudio de la diversidad microbiana del suelo**

La heterogeneidad en el suelo está determinada por la diversidad de especies, diversidad genética y la biodiversidad del ecosistema (Solbrig, 1991). La diversidad de especies consiste en la riqueza de las mismas, es decir el total de especies presentes, equidad de especies, como así también la distribución de especies (Ovrek, 2000). Sin embargo, la

definición clásica de especies utilizada en plantas y animales superiores no se aplica fácilmente a los procariotas (Godfray y Lawton, 2001) u organismos asexuales. El concepto de especie más aceptado en la actualidad para los procariotas es operacional, radicado en el grado de cinética de reasociación ADN-ADN. En esta definición, dos cepas pertenecen a la misma especie cuando su ADN genómico purificado muestra al menos 70% de hibridación. Este nivel de hibridación es equivalente, generalmente, a una identidad  $\geq 97\%$  de nucleótidos en el gen de ARN ribosomal 16S (Stackebrandt y Goebel, 1994) y  $\approx 94\%$  en el promedio de identidad de nucleótidos de todo el genoma (Konstantinidis y Tiedje, 2005).

La mayoría de los estudios filogenéticos de muestras ambientales, incluso antes de que el término metagenómica entrara en uso, se han centrado en la subunidad menor del ARN ribosomal (SSU rRNA, comúnmente conocido como el gen ARNr 16S en procariotas y el gen ARNr 18S en eucariotas) (Pace *et al.*, 1986; Schmidt, 1991). Numerosas razones justificaron su elección como marcador molecular (Baker *et al.*, 2003). En primer lugar, este gen está universalmente distribuido a través de todos los organismos celulares. Tal distribución universal permite la potencial identificación, comparación y valoración de todos los organismos celulares en cualquier medio ambiente. En segundo lugar, este gen es funcionalmente homólogo en todos los seres vivos. Dicha homogeneidad funcional asegura que la comparación realizada sea significativa. En tercer lugar, debido a su restricción funcional, sus estructuras terciarias y secundarias son altamente conservadas, haciendo que sus secuencias primarias sean relativamente estables en escalas de tiempo evolutivo. Esta relativa estabilidad evolutiva es esencial para analizar la relación taxonómica entre el organismo y las secuencias por encima del nivel de la especie. Cuarto, este gen ha demostrado estar evolucionando a una velocidad relativamente constante a lo largo del tiempo, lo que permite inferencias de divergencia relativa entre amplios grupos de organismos, desde bacterias a arqueobacterias, hasta plantas y animales. Por último, están disponibles tanto cebadores de PCR universales como específicos de grupos, que permiten la amplificación específica de este gen en los organismos blancos (Baker *et al.*, 2003; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Por otro lado, la región de los espaciadores de transcritos intergénicos (ITS, por sus siglas en inglés) ha sido reconocida como el código de barras fúngico oficial y se utiliza comúnmente como marcador molecular en estudios de ecología de hongos debido al gran número de copias por célula y de secuencias depositadas en bases de datos internacionales. La región ITS se divide en ITS1 e ITS2, que están separados por el gen que codifica para el ARNr 5.8S. El cistrón de ARNr eucariótico consiste en los genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S transcritos como una unidad por ARN polimerasa I. Los procesos postranscripcionales

dividen el cistrón, eliminando dos espaciadores transcritos internos. Estos dos espaciadores se denominan normalmente región ITS (Schoch *et al.*, 2012).

Las comunidades microbianas del suelo se caracterizan por sus propiedades fenotípicas y la diversidad genética. Los métodos para evaluar dicha diversidad microbiana en los suelos se basan en técnicas bioquímicas y técnicas moleculares (Kirk *et al.*, 2004).

Dentro de las técnicas bioquímicas se encuentran el recuento en placas, perfiles fisiológicos de patrones con diferentes fuentes de carbono y análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés “Fatty Acid Methyl Ester”). La técnica de recuento en placa, sin duda una de las más utilizadas, es un método tradicional dependiente de cultivo, es rápido, de bajo costo y puede proporcionar información directa de los componentes heterotróficos de una población (Tabacchioni *et al.*, 2000). El inconveniente principal de esta técnica es que es muy poco representativa de las comunidades de microorganismos, ya que solo entre el 0,1 a 1% de las bacterias del suelo pueden ser cultivadas con las prácticas convencionales de laboratorio (Torsvik *et al.*, 1998). Además existen otras desventajas que incluyen la dificultad de desprender las bacterias o esporas de las partículas del suelo o biofilms, seleccionar el medio de crecimiento (Tabacchioni *et al.*, 2000) y las condiciones de crecimiento (Temperatura, pH y luz), la incapacidad física de permitir crecer un gran número de microorganismos y la potencial inhibición que se podría producir entre diferentes colonias (Trevors, 1998). Cabe destacar además, que con este tipo de metodología de estudio se favorece a los microorganismos con altas tasas de crecimiento y a aquellos que producen grandes cantidades de esporas (Dix y Webster, 1995). Todas estas limitaciones pueden influir en la aparente diversidad microbiana de la comunidad (Kirk *et al.*, 2004). Con respecto a los hongos se estima que hay 1.5 millones de especies en todo el mundo, pero a diferencia de las bacterias, los actuales métodos de cultivos estándares de laboratorio no pueden ser utilizados para muchos de ellos (van Elsas *et al.*, 2000).

Dentro de las técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana se han desarrollado una gran cantidad de procedimientos. Estas metodologías consisten en la reasociación de ADN, hibridación de ADN/ADN y ADN/ARN, clonación y secuenciación de ADN; además hay otras basadas en PCR, tales como la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE por sus siglas en inglés “Denaturing gradient gel electrophoresis”), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE por sus siglas en inglés “temperature gradient gel electrophoresis”), análisis de espaciadores intergénicos ribosomales (RISA por sus siglas en inglés “Ribosomal intergenic spacer analysis”), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés “Restriction fragment length polymorphism”), entre otras (Kirk *et al.*, 2004).

La idea más simple para describir y cuantificar una comunidad microbiana es el concepto de riqueza de especies, que se refiere al número de especies en una región específica. Otra idea, tomada de la ecología, que se puede aplicar a la ecología microbiana, es el concepto de igualdad o abundancia diferencial propuesto por Simpson (1949). La diversidad implica riqueza (o el número de especies presentes) y uniformidad (o abundancia en el número de individuos para cada especie). Los índices de diversidad proporcionan un resumen de riqueza y abundancia al combinar estas dos facetas de la diversidad en una sola estadística. Hay muchas maneras por las cuales la riqueza y la abundancia pueden ser combinadas y esto ha dado lugar a múltiples índices de diversidad. Algunos de los índices más comunes son los índices de la serie Shannon y Simpson. Además, la riqueza ha sido estimada por el estimador de cobertura basado en la abundancia (ACE), que es un estimador de riqueza no paramétrico basado en la distribución de OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales, por sus siglas en inglés) abundantes ( $> 10$ ) y raros ( $\leq 10$ ) y el estimador de riqueza Chao1, que es un estimador de riqueza no paramétrico basado en la distribución de singletons y doubletons (Nacke *et al.*, 2011). El término OTUs es utilizado para la distinción de especies en microbiología, comúnmente se utiliza el gen de ARNr y un porcentaje de umbral de similitud para clasificar microbios, dentro del mismo o diferentes OTUs. Estos índices corresponden al tipo de diversidad conocida como alfa, que es descripta por el número de taxones y su abundancia dentro de las comunidades o hábitats (Whittaker, 1972), es decir, respondiendo las preguntas de ¿Quiénes están allí? y ¿Cuántos hay?. Además otro tipo de diversidad conocida como beta, definida como variación en la composición de la comunidad y medida en términos de a pares, entre las parcelas (Whittaker, 1972). Es decir, respondiendo la pregunta ¿Cuán similares son las muestras comparadas de a pares?. Dentro de este tipo de diversidad pueden utilizarse dos tipos de índices, por un lado los de tipo de incidencia y por el otro del tipo de abundancia. Los primeros, como los índices Jaccard y Sørensen, tratan igualmente a las especies comunes y raras, comparando el número de taxones compartidos y únicos entre las muestras. El índice de tipo abundancia contempla la similitud de la abundancia, tratando así a los individuos y no a las especies por igual, algunos ejemplos son los índices de disimilitud tipo Morisita y Bray-Curtis (Chao *et. al.*, 2006). Estos índices se ven afectados por el tamaño de muestreo. Por otra parte, UniFrac es un método para comparar las comunidades microbianas a través de la información de distancia filogenética contenida en los genes marcadores como el gen del ARNr 16S (Lozupone y Knight, 2005).

## 1.8.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La técnica DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes de ADN (urea/formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la corrida electroforética se mantiene una temperatura constante de 50 a 65°C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea/formamida con la cual los fragmentos se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración desnaturizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrógeno dependiendo si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina (Myers *et al.*, 1987). La técnica fue desarrollada originalmente para detectar mutaciones puntuales en las secuencias de ADN. Posteriormente, a partir de los trabajos propuestos por Muyzer *et al.* (1993), la técnica se adaptó para el análisis de la estructura y dinámica de comunidades microbianas complejas. La metodología consiste en la extracción de ADN de muestras de suelo que se amplifican por PCR, utilizando un cebador directo con un clamp-GC de alrededor 40 pb en el extremo 5', y de acuerdo al marcador utilizado se pueden realizar estudios filogenéticos o funcionales dentro de las comunidades del suelo. Utilizando esta técnica se han realizado investigaciones para analizar variación de comunidades de bacterias, arqueobacterias y hongos totales en suelos agrícolas (Pereira e Silva *et al.*, 2012), para estimar la abundancia y composición de comunidades fijadoras de nitrógeno por medio de la amplificación del gen *nifH* (Pereira e Silva *et al.*, 2013) y estudiar las comunidades de bacterias oxidantes y reductoras de azufre (Varon-Lopez *et al.*, 2014). La ventaja de esta técnica radica en que se pueden analizar múltiples muestras en simultáneo por lo que se hace posible seguir cambios en las poblaciones microbianas (Muyzer, 1999). Además permite recuperar las bandas del gel para posteriores estudios como, por ejemplo una secuenciación, permitiendo obtener una mayor información. También es una técnica rápida, sensible, reproducible y de bajo costo. Por otro lado, dentro de las desventajas se debe tener en cuenta una eficiencia variable en la extracción de ADN (Theron y Cloete, 2000), y que en la reacción de PCR previa se pueden introducir errores como amplificaciones preferenciales, formación de moléculas quiméricas (Von Wintzingerode *et al.*, 1997) y heteroduplex (Thompson *et al.*, 2002). Igualmente no se pueden detectar aquellos microorganismos que constituyen menos del 1% de la comunidad (Muyzer *et al.*, 1993). Así también fragmentos de diferentes ADN pueden tener movilidades similares en

el gel (Gelsomino *et al.*, 1999) y una especie bacteriana puede dar lugar a múltiples bandas a causa del alto número de copias del gen de ARNr 16S con secuencias ligeramente diferentes (Kirk *et al.*, 2004). Sin embargo, es una técnica muy utilizada en todo el mundo y que combinada a otras técnicas brinda una información muy valiosa para estudios de ecología microbiana.

### 1.8.3. Secuenciación masiva de amplicones

Para estudiar el material genético de entornos naturales, el primer paso es extraer las moléculas de ADN de la muestra ambiental. Cualquier muestra ambiental probablemente contendrá una variedad de organismos que incluye: bacterias, arqueobacterias, virus, protozoos, algas, hongos, plantas y animales. Los diferentes grupos de organismos tienen distintos tipos de células y componentes estructurales. Entre los diferentes tipos de células podemos encontrar, por ejemplo, células vegetativas de crecimiento rápido (metabólicamente activas) o esporas en reposo (metabólicamente inactivas) o células viables pero no cultivables. Esta heterogeneidad estructural puede influir de manera diferente en la eficiencia de extracción de las moléculas de ADN de dichas células (Xu, 2011).

El término metagenómica fue acuñado por primera vez por Handelsman *et al.* (1998) para describir el campo emergente que analiza material genético recuperado directamente de muestras ambientales. El advenimiento de la secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés) o secuenciación de alto rendimiento, ha revolucionado el campo de la ecología microbiana y ha llevado los estudios ecológicos clásicos a otro nivel. Este tipo de tecnología de vanguardia ha llevado al establecimiento del campo de la "metagenómica", definido como el análisis genético directo de los genomas contenidos dentro de una muestra ambiental sin la necesidad de realizar previamente cultivos clonales (Oulas *et al.*, 2015). Las principales preguntas a responder en la ecología microbiana son "¿Quiénes están ahí afuera?" y "¿Qué están haciendo?", y, de hecho, la metagenómica puede responder a ambas preguntas. En particular, la diversidad microbiana se puede determinar usando dos enfoques diferentes: secuenciación de amplicón y metagenómica "shotgun". En el primer enfoque, regiones específicas de ADN de las comunidades se amplifican utilizando cebadores para secuencias taxonómicamente informativas, tales como el gen del ARNr 16S para procariotas, o ITS y el gen de la subunidad ribosomal mayor (LSU) para eucariotas (Sharpton, 2014; Tonge *et al.*, 2014). En el segundo enfoque, la metagenómica "shotgun" puede ayudar a reconstruir grandes fragmentos o incluso genomas completos de organismos en una comunidad sin

aislamiento previo, permitiendo la caracterización de un gran número de secuencias codificantes y no codificantes que pueden usarse como marcadores filogenéticos.

La tecnología de secuenciación de primera generación fue desarrollada por Sanger *et al.*, 1977 y revolucionó el estudio y la clasificación de los microorganismos. En la actualidad se han desarrollado plataformas de bajo costo, conocidas como tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS). Estas nuevas tecnologías son capaces de secuenciar en paralelo millones de moléculas de ADN con diferentes rendimientos y longitudes de secuencia, lo cual causó un impacto positivo en diferentes áreas (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015). Cada empresa tiene su plataforma de secuenciación particular, específicamente en este trabajo se utilizó Illumina, por lo cual se describirá su fundamentación. La tecnología de Illumina consiste en una secuenciación por síntesis y comienza con la unión de moléculas de ADN a los cebadores en un soporte sólido, seguido de la amplificación de ese ADN para producir colonias o grupos locales de los fragmentos amplificados. Esta generación de grupos de ADN se acompaña con la adición de bases marcadas fluorescentemente (adenina, citosina, guanina y timina) unidas con un grupo de bloqueo de terminación reversible. Las cuatro bases compiten entonces por los sitios de unión en el ADN molde a secuenciar y las moléculas no incorporadas se eliminan por lavado. Después de cada ciclo de síntesis, se utiliza un láser para excitar los diferentes fluorocromos y se realiza una exploración de alta resolución de la base incorporada. Posteriormente, una etapa de desbloqueo químico asegura la separación del grupo de bloqueo terminal 3' y del colorante en un solo paso. El proceso se repite hasta que se secuencie la molécula de ADN completa. La empresa Illumina tiene diferentes equipos de secuenciación dedicados a diferentes aplicaciones. Por ejemplo, MiSeq tiene una salida de 15 GB y 25 millones de lecturas secuenciales de 300 pb de longitud. Además, los fragmentos correspondientes a cada grupo pueden secuenciarse desde ambos extremos (secuenciación en pares o paired-end), los cuales pueden combinarse para obtener lecturas de 600 pb en vez de los 300 pb originales. El equipo HiSeq2500 tiene una salida mucho mayor (1000 GB por ejecución) pero brinda lecturas de 125 pb (Oulas *et al.*, 2015). Esta plataforma no incorpora errores del tipo de homopolímeros debido a que incorpora de a una base a la vez, pero hay que considerar el error propio de las enzimas ADN polimerasas en la incorporación de los dNTPs.

Las herramientas utilizadas comúnmente para el análisis y limpieza (del inglés denoising) de los datos 16S incluyen QIIME (Caporaso *et al.*, 2010), Mothur (Schloss *et al.*, 2009), SILVAngs (Quast *et al.*, 2013), MEGAN (Huson *et al.*, 2007) y AmpliconNoise (Quince *et al.*, 2011). El análisis generalmente requiere una base de datos de referencia que se utiliza para buscar coincidencias con los OTUs generados y de la cual se deduce un linaje taxonómico. Algunas bases de datos ampliamente utilizadas incluyen

Greengenes para 16S (DeSantis *et al.*, 2006), Ribosomal Database Project para 16S (Cole *et al.*, 2007, 2009; Maidak *et al.*, 1996), Silva para 16S y 18S (Quast *et al.*, 2013; Pruesse *et al.*, 2007) y Unite para ITS (Kõljalg *et al.*, 2013). La limpieza de las secuencias es importante para el análisis de datos y es específico de cada plataforma. Un procedimiento llamado "flowgram clustering" o diagrama de flujo elimina las lecturas problemáticas y aumenta la precisión del análisis taxonómico. Varios algoritmos de limpieza se han desarrollado hasta ahora, que generalmente utilizan los siguientes pasos básicos de eliminación: 1) Filtrado de lecturas ruidosas: las lecturas se cortan en base a una puntuación de calidad de la lectura; 2) Quitar el ruido de la PCR: las secuencias verdaderas y sus frecuencias son inferidas por un algoritmo de maximización de expectativa; 3) Identificación y eliminación de las quimeras: para cada secuencia, se realizan alineaciones exactas de a pares con todas las secuencias, con mayor o menor abundancia, que serán el conjunto de referencias posibles. Aunque se pierde un número considerable de secuencias durante el proceso de limpieza, las secuencias resultantes son de alta calidad. Además, se ha sugerido que el uso de diferentes métodos de limpieza de secuencias puede producir resultados significativamente diferentes, los cuales deben ser considerados cuidadosamente al comparar estudios que han utilizado diferentes algoritmos para el análisis de datos (Oulas *et al.*, 2015).

Posteriormente se agrupan, se eligen (picking del inglés) y se asignan los OTUs. El primer paso es la asignación de las lecturas a las diferentes muestras usando la información del código de barras (es una secuencia de ADN corta y específica de cada muestra, que se añade durante la amplificación, permitiendo que las muestras sean mezcladas para reducir el costo de secuenciación), el siguiente paso es la elección de OTUs. Para las bacterias / arqueobacterias, se aceptan OTUs con una similitud superior al 97% que corresponden a la misma especie. Existen numerosas estrategias de asignación de OTUs: 1) De *novo*, que se utiliza si los amplicones se superponen y si no se dispone de una colección de secuencias de referencia. Agrupa todas las lecturas sin usar una referencia y es bastante laborioso desde el punto de vista computacional, por lo tanto no es muy conveniente para los conjuntos de datos muy grandes. 2) Referencia cerrada, la cual se utiliza si los amplicones no se superponen y si una colección de secuencias de referencia está disponible. 3) Referencia abierta, se utiliza si los amplicones se superponen y un conjunto de datos de referencia está disponible. Con este método las lecturas se comparan con un conjunto de datos de referencia, pero si las lecturas no coinciden con la referencia, se agrupan en consecuencia *de novo*. Todos los programas que permiten realizar todos los pasos para la obtención de OTUs, detallados anteriormente, están incorporados a QIIME. La asignación taxonómica de OTU se puede realizar usando una variedad de algoritmos y QIIME soporta numerosos algoritmos, como



BLAST, el clasificador RDP, RTAX, clasificador Mothur y uclust, para buscar la coincidencia más cercana a una OTU de la cual se deduce un linaje taxonómico (Oulas *et al.*, 2015). Para el análisis estadístico y la visualización de resultados, la salida de los datos de QIIME se pueden importar en MEGAN para su visualización o en cualquier otro Software estadístico que permite datos tipo matriz. Además, el análisis de las diversidades alfa y beta, así como la composición taxonómica y los análisis filogenéticos, se realizan a través de QIIME. Existen muchas otras herramientas y paquetes de software para realizar el análisis estadístico de los datos metagenómicos. El paquete Primer-E (Clarke y Gorley, 2006) es comúnmente utilizado por los ecologistas microbianos y permite múltiples análisis estadísticos multivariados, tales como escalamiento multidimensional (MDS), análisis de similitudes (ANOSIM) y pruebas de hipótesis. Recientemente, el lenguaje de programación estadística R (Team RDC 2008) ha ganado popularidad y actualmente se utiliza ampliamente para estadísticas multivariadas (Oulas *et al.*, 2015).

## 2. Hipótesis y objetivos

### 2.1. Hipótesis de trabajo

La aplicación a campo del formulado de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 ejerce efectos benéficos en el cultivo de maní que se traducen en plantas más sanas y con mayores rendimientos a cosecha, aun en ausencia de patógenos, sin generar impactos significativos en la comunidad microbiana del suelo.

### 2.2. Objetivos general y específicos

#### 2.2.1. Objetivo general

El objetivo general del estudio fue investigar la efectividad de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 para controlar el carbón del maní causado por *Thecaphora frezzi*. Así como también evaluar los efectos secundarios producidos por la aplicación del biocontrolador, tales como la promoción del crecimiento de la planta de maní y el rendimiento del cultivo a cosecha. Además, el impacto que produce la cepa sobre las comunidades microbianas del suelo.

#### 2.2.2. Objetivos específicos

##### 2.2.2.1. En invernadero

- Investigar el efecto del bioformulado a base de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre plantas de maní en condiciones controladas en invernadero, evaluando parámetros de crecimiento de la planta.

##### 2.2.2.2. A campo

- Investigar el efecto del bioformulado a base de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre plantas de maní en campos experimentales y comerciales, evaluando parámetros de crecimiento de la planta y rendimientos del cultivo.

## Hipótesis y objetivos

- Determinar el efecto de la inoculación con la cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre la incidencia y severidad del carbón de maní.
- Evaluar el impacto de la inoculación con el bioformulado a base de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre las comunidades microbianas del suelo.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636

La cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 fue aislada de suelo cultivado con maní por investigadores del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) como potencial agente de biocontrol de la podredumbre parda de la raíz de maní (causada por *Fusarium solani*), el cual posteriormente fue confirmado en ensayos a campo. Además, la cepa fue depositada en el Istituto Tossine e Micotossine (ITEM) da Parassiti Vegetali, en Italia (Rojo *et al.*, 2007).

### 3.2. Tolerancia de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 al curasemilla

Se evaluó el efecto de tolerancia de la cepa de *Trichoderma* frente al curasemilla Options Advance (NOVA), compuesto por 20% p/v de carboxin (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatiin-3-carboxanilida), 10% p/v de metiltiofanato [dimetil 4,4'- (o-fenilen) bis(3-tioalofanato)] y 1,33 % p/v metalaxil [metil N- metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato]. En primer término se realizó una desinfección superficial de las semillas de maní, para ello se realizaron 2 lavados, uno de ellos con etanol 70% v/v por 5 min y el otro con hipoclorito de Sodio (2% v/v) por 1 min. A continuación se realizaron 3 lavados sucesivos de 1 min cada uno, con agua destilada estéril. Luego, por un lado, se realizó un ensayo cualitativo para el cual se procedió a curar las semillas con el fungicida en la misma proporción que se utiliza a campo (400 ml/ 100kg de semillas) permitiendo que las semillas se secan en esterilidad dentro de la cabina de flujo laminar. Posteriormente se efectuó el peleteado de las semillas, utilizando 1 ml de carboximetilcelulosa (CMC) al 2% p/v y 1 ml de la suspensión de conidios ( $5 \cdot 10^6$  conidios/ml) para el tratamiento peleteado y 1 ml de CMC al 2% p/v y 1 ml de agua destilada estéril para el tratamiento control. Del mismo modo, las semillas se dejaron secar en esterilidad y se realizaron mezclas periódicas de las mismas. Por último, se sembraron 4 semillas de cada tratamiento en placas con agar agua (1,5% p/v) y se incubaron a 25°C con periodos de 12 horas de luz/oscuridad por 4 días.

Por otro lado, se realizó un ensayo cualitativo de recuento de la viabilidad de conidios en presencia del curasemilla, al igual que para el ensayo anterior, se utilizaron las semillas desinfectadas. En este caso, a uno de los tratamientos se le aplicó el curasemillas en la dosis recomendada a campo (400 ml/ 100kg de semillas) y para el otro tratamiento, correspondiente al control, se aplicó la misma cantidad de agua destilada estéril. Luego

para ambos tratamientos se realizó el peleteado de las semillas con 1 ml CMC al 2% p/v y 1 ml de la suspensión de conidios ( $5 \cdot 10^6$  conidios/ml), posteriormente las semillas fueron secadas en esterilidad. El número de Unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado en tres tiempos diferentes (Tiempo 0, 3 y 7 días), permaneciendo las semillas en esterilidad y a temperatura ambiente. Para realizar el recuento de esporas viables, la muestra de 1 g de semillas fue agitada por 1 min en 9 ml de agua destilada estéril, se realizaron diluciones seriadas y se sembró una alícuota que fue dispersada con una espátula de Drigalsky en placas de Petri con el medio sólido Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Las placas se incubaron por 5 días a 25 ° C en un ciclo de 12 h de luz / oscuridad. Este experimento fue realizado por duplicado.

### **3.3. Efecto de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre el crecimiento y rendimiento de maní**

#### **3.3.1. Material vegetal**

Maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Granoleico. Este cultivar fue lanzado en el año 2002 por el criadero “El Carmen” (General Cabrera, Córdoba) y ha sido producido por la cruce de las variedades Tegua e I-JS-95-1, con una posterior selección genealógica.

#### **3.3.2. Preparación del inóculo de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636**

El inóculo de *T. harzianum* ITEM 3636 se obtuvo a partir de cultivos de 7 días sobre placas de Petri conteniendo medio agar extracto de malta (MEA) incubadas a 25°C con periodos de 12 horas de luz/oscuridad. La suspensión de conidios se cosechó cubriendo cada una de 10 placas con 10 ml de agua destilada estéril y raspando las superficies de los cultivos con una espátula de vidrio esterilizada. Luego de filtrar la suspensión a través de dos capas de gasa estéril, se determinó la concentración de conidios en la misma mediante recuento en una cámara de Neubauer. La suspensión se diluyó con agua destilada estéril para obtener la concentración de conidios requerida para los ensayos. La densidad del inóculo se ajustó a  $1 \cdot 10^8$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ .

### 3.3.3. Ensayos en cámara de crecimiento vegetal

Los ensayos en cámara de crecimiento se realizaron con el propósito de evaluar el efecto de *T. harzianum* ITEM 3636 sobre la emergencia, en semillas con y sin tratamiento químico, como así también sobre el crecimiento temprano de las plántulas. Asimismo, se ensayaron dos métodos de inoculación (Ensayo I y II) para determinar si la misma estaría influenciada por el modo de aplicación del formulado. Estos estudios preliminares aportaron al diseño de los futuros ensayos en invernáculo y a campo.

El ensayo I se llevó a cabo en una cámara de crecimiento frío-calor Sematic (modelo I-501PF) con condiciones de luz y temperatura controladas durante 40 días. Brevemente, 10 g de semillas de maní sin el agregado de fungicida químico en su superficie y sin desinfectar se trataron con 1 ml de carboximetilcelulosa (CMC) al 2% p/v y 1 ml de una suspensión conidial de *T. harzianum* ITEM 3636 conteniendo  $5 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ . Luego, las semillas se dejaron secar dentro de la cabina de flujo laminar. Las semillas control se trataron con CMC al 2% p/v y 1 ml de agua destilada estéril. Bolsas de polietileno (diámetro de 8 cm y altura de 15 cm) se cargaron con 500 g de una mezcla esterilizada de tierra:arena (1:1). La mezcla se esterilizó en una estufa de circulación de aire forzada (Tecno Dalvo) a  $180^{\circ}\text{C}$  durante tres horas. Este proceso se repitió 3 veces. La mezcla contenida en cada maceta se regó hasta obtener una capacidad de campo del 60%. Se sembraron tres semillas por bolsa. Las bolsas se mantuvieron en la incubadora bajo las siguientes condiciones: 16 h de luz a  $28^{\circ}\text{C}$  y 8 h de oscuridad a  $20^{\circ}\text{C}$ . Luego de la emergencia, se raleó para obtener una plántula por bolsa. Los 2 tratamientos fueron los siguientes: (1) plántulas control sin inocular, (2) inoculadas con *T. harzianum* 3636. Se utilizaron 20 réplicas por tratamiento. A los 40 días, las plántulas se retiraron cuidadosamente de las bolsas y se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento: longitud radicular, longitud de parte aérea, peso seco parte aérea y peso seco radicular.

En el ensayo II se utilizaron semillas de maní recubiertas con fungicida químico, el inóculo microbiano se aplicó sobre las semillas de forma líquida al momento de la siembra. Las semillas se trataron con 1 ml de la suspensión de *T. harzianum* ITEM 3636 ( $5 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ ), en el control, las semillas se trataron con 1 ml de agua destilada estéril. A cosecha se registraron los mismos parámetros que en el ensayo anterior.

## 3.3.4. Ensayo en invernadero

### 3.3.4.1. Diseño experimental

Las macetas (23 cm de diámetro y 20 cm de altura) se lavaron y se desinfectaron secuencialmente con una solución de etanol al 70% v/v y de hipoclorito de sodio al 10% v/v. Posteriormente se cargaron con 5 Kg de una mezcla estéril de tierra:arena fina (1:1). La mezcla se esterilizó en una estufa de circulación de aire forzada (Tecno Dalvo) a 180°C durante tres horas. Este proceso se repitió 3 veces. El sustrato contenido en cada maceta se regó hasta obtener una capacidad de campo del 60%. Se realizaron orificios de 5 cm de profundidad y se sembró una semilla de maní por orificio. Se sembraron 4 semillas por maceta y se utilizaron 10 macetas por tratamiento. Luego de la germinación, las plántulas se ralearon para dejar 2 plántulas por maceta. Los tratamientos fueron:

- Inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636.
- Tratamiento con agua destilada estéril (control).

Las semillas empleadas estaban recubiertas por el fungicida químico Options Advance (Nova) en la dosis utilizada a campo. La inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 se realizó como en el ensayo II en cámara; cada semilla fue inoculada con 1 ml de la suspensión de conidios ( $5 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>). En el caso del control negativo, se aplicó 1 ml de agua destilada estéril por semilla.

Las macetas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (aproximadamente 30-35°C durante el día y 15-20°C durante la noche). Las plantas se regaron cada tres días y se cosecharon a los 120 días post-siembra. A los 75 días post-siembra se determinó el peso fresco de la planta, longitud y peso seco de las partes aéreas y de las raíces.

A cosecha se evaluó el peso de vainas y peso de granos (Fernández y Giayetto, 2006).

### 3.3.4.2. Colonización de la rizósfera de maní

Se evaluó la supervivencia de *T. harzianum* 3636 en la rizósfera de las plántulas de maní de acuerdo a una modificación de la técnica descrita por Landa *et al.* (2004). Se extrajo 1 g de suelo rizosférico (adherido a las raíces) a partir de una plántula seleccionada al azar. A continuación, se realizaron diluciones seriadas y 100 µl fueron inoculados en la

superficie de placas conteniendo medio Heller y Theiler-Hedtrich, posteriormente el inóculo se dispersó con una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron 48 h a 28 °C. Se contaron las colonias desarrolladas y se calculó el número de UFC g<sup>-1</sup> de mezcla.

### 3.3.5. Ensayos a campo

#### 3.3.5.1. Campaña 2014-2015

El ensayo se realizó en un campo comercial (32°45'36.33" S 63°51'21.35" W) de la zona de General Cabrera (Provincia de Córdoba) con antecedentes de carbón de maní (*Thecaphora frezii*). La aplicación del bioformulado a base de *T. harzianum* ITEM 3636 se aplicó mediante pelleteo de semillas "curadas" (recubiertas con fungicida químico), luego del tratamiento de las mismas con CMC al 2% p/v. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Semillas peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636: la relación utilizada fue de 10 g de semillas de maní con 1 ml de CMC al 2% p/v y 1 ml de la suspensión de *T. harzianum* ITEM 3636 ( $5 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>). Las semillas se dejaron secar bajo flujo laminar, con agitación periódica. La concentración de *T. harzianum* ITEM 3636 por semilla se evaluó por medio de un recuento de colonias en el medio Agar diclorán - rosa de bengala - cloranfenicol (DRBC).
- Control: se empleó la misma relación que para el tratamiento de las semillas inoculadas, 10 g de semillas de maní con 1 ml de CMC al 2% p/v y 1 ml de agua destilada estéril. Las semillas se dejaron secar bajo flujo laminar, con agitación periódica.

La siembra se realizó en el mes de Noviembre. Los ensayos se realizaron en parcelas de 28 m<sup>2</sup> (4 surcos; 10 m x 2,8 m), en un diseño de bloques completamente al azar (Tabla 2), se diseñaron 3 tratamientos, con cuatro réplicas cada uno (de los cuales se realizaron solamente 2 debido a la falta de disponibilidad de maquinaria adecuada). Se mantuvo un espacio entre surcos y entre plantas de 70 y 8 cm, respectivamente; con una densidad de siembra de 120 kg ha<sup>-1</sup> y una profundidad de 5 cm. Se utilizaron las dosis recomendadas de fertilizantes. Para evitar el efecto de malezas y plagas sobre el crecimiento y el



rendimiento del cultivo, se aplicaron plaguicidas a las dosis recomendadas para mantener a las mismas por debajo del nivel de daño económico.

Se registraron las prácticas agrícolas utilizadas en el manejo del cultivo, los cultivos antecesores, los datos climáticos y se realizaron análisis de las características físicas y químicas del suelo.

### 3.3.5.2. Campaña 2015-2016

#### 3.3.5.2.1. Ensayo a campo 1

El ensayo se realizó en un campo comercial (33°04'40.99" S 64°31'06.99" W) de la zona de Cuatro Vientos (Provincia de Córdoba). El bioformulado a base de *T. harzianum* ITEM 3636 se aplicó mediante peleteo de semillas "curadas" (recubiertas con fungicida químico), luego del tratamiento de las mismas con CMC al 2% p/v, o mediante riego al momento de la siembra. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Semillas peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636: la relación utilizada fue de 10 g de semillas de maní con 1 ml de CMC al 2% p/v y 1 ml de la suspensión de *T. harzianum* ITEM 3636 ( $5 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>). Las semillas se dejaron secar bajo flujo laminar, con agitación periódica.
- Control peleteo: se empleó la misma relación que para el tratamiento de las semillas inoculadas, 10 g de semillas de maní con 1 ml de CMC al 2%p/v y 1 ml de agua destilada estéril. Las semillas se dejaron secar bajo flujo laminar, con agitación periódica.
- Semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636 mediante riego al momento de la siembra (surco): se aplicaron 25 ml de suspensión de conidios ( $5 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>) por cada surco (5 metros) empleando un pulverizador a presión (Farmate). Las semillas se cubrieron inmediatamente luego de la inoculación.
- Control inoculación en surco: se aplicaron 25 ml de agua destilada por cada surco (5 metros). Las semillas se cubrieron inmediatamente luego del riego.

La siembra se realizó en el mes de diciembre. Los ensayos se realizaron en parcelas de 15 m<sup>2</sup> (5 surcos; 5 m x 3 m), en un diseño de bloques completamente al azar (Tabla 3), se diseñaron 4 tratamientos, con cuatro réplicas cada uno (de las cuales sólo se evaluaron dos por tratamiento debido al avance de las malezas sobre la mitad del sector donde se realizó la siembra). Se mantuvo un espacio entre surcos y entre plantas de 70 y 8 cm, respectivamente; con una densidad de siembra de 120 kg ha<sup>-1</sup> y una profundidad de ~5 cm.

### 3.3.5.2.2. Ensayo a campo 2

El ensayo se realizó en un campo comercial (32°87'84.23" S 63°91'52.15" W) de la zona de General Cabrera (Provincia de Córdoba) con antecedentes de carbón de maní (*Thecaphora frezii*). El bioformulado a base de *T. harzianum* ITEM 3636 se preparó y aplicó de la misma manera que para el ensayo a campo 1. Además en los dos estudios se utilizaron los mismos tratamientos. Solo se varió el diseño de los tratamientos y el número y longitud de los surcos (Tabla 4). Para este caso se trabajó con 2 surcos de 10 m en cada parcela (aproximadamente 7 m<sup>2</sup>).

### 3.3.5.3. Campaña 2016-2017

El ensayo se realizó en el campo comercial "El Carmen" (32°49'42.1" S 63°51'58.2" W) de la zona de General Cabrera (Provincia de Córdoba) con antecedentes de carbón de maní (*Thecaphora frezii*). En este ensayo se evaluaron solo dos tratamientos, que fueron el peleteado con la cepa de *Trichoderma* y el control peleteado, ambos tratamientos fueron realizados del mismo modo que fue descrito en los ensayos a campo anteriores. Para este caso se trabajó con 4 surcos de 5 m en cada parcela (aproximadamente 14 m<sup>2</sup>).

### 3.3.6. Efecto sobre el crecimiento de las plantas y rendimiento a cosecha

A los 15 días post-siembra se evaluó la emergencia de plantas para asegurar un número mínimo de plantas por tratamiento. A los 75 días de la siembra se tomaron al azar diez plantas por parcela para evaluar peso fresco total, peso seco aéreo, peso seco radicular,

peso seco de los nódulos, altura de la planta y longitud de la raíz. A cosecha, se recolectaron las plantas de 1m<sup>2</sup> de cada unidad experimental (parcela) para determinar los componentes directos del rendimiento y calidad comercial de maní: peso de granos y granos calidad confitería (tamaño superior a zaranda 7,5 mm), siendo este último parámetro muy importante por el precio diferencial del maní confitería respecto al industria (Fernandez y Giayetto, 2006).

### 3.4 *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 como biocontrolador del agente causal del carbón del maní

#### 3.4.1. Determinación de la intensidad de la enfermedad

La intensidad de la enfermedad se evaluó en los tres ensayos a campo próximos a la zona de General Cabrera, descritos anteriormente, y fue realizada a cosecha sobre la totalidad de las plantas obtenidas a partir de 1m<sup>2</sup> de cada parcela. El efecto de la enfermedad sobre el rendimiento se cuantificó a través de incidencia (Porcentaje de vainas enfermas) y severidad de la enfermedad (Figura 6) a través de una escala de 0-4, donde, 0: Granos sin carbón, sin síntomas visibles; 1: vaina normal, una semilla con pequeño soro; 2: vaina deformada o no, una semilla mitad afectada; 3: vaina malformada y toda una semilla carbonosa y 4: vaina malformada y las dos semillas carbonosas. Esta escala fue desarrollada y validada para nuestra región productiva (Astiz Gassó *et al.*, 2008; Marinelli *et al.*, 2008), y presenta una estrecha relación con las pérdidas producidas por la enfermedad (Oddino *et al.*, 2010). A partir de dicha clasificación, se calculó el índice de severidad de la enfermedad (MSI), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{MSI} = [(n \times 0) + (n \times 1) + \dots + (n \times 4)] N^{-1}$$

Donde *n* es el número de vainas que corresponden a cada clasificación de la enfermedad (0–4) y *N* es el número total de vainas observadas.



**Figura 6:** Escala de daño de granos para cuantificar la severidad del carbón del maní. Siendo 0: Granos sin carbón, sin síntomas visibles; 1: vaina normal, una semilla con pequeño soro; 2: vaina deformada o no, una semilla mitad afectada; 3: vaina malformada y toda una semilla carbonosa y 4: vaina malformada y las dos semillas carbonosas.

### 3.5. Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos de los ensayos de promoción de crecimiento/rendimiento, como los de biocontrol se realizaron utilizando InfoStat Professional V 2009 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y Sigma Stat para Windows V 2.03 (SPSS Inc.). Todos los datos se evaluaron a través de análisis de varianza (ANOVA), los residuos fueron testeados para normalidad utilizando el test de Holm Sidak. Para testear la diferencia entre medias se utilizó el test LSD con un nivel de significancia de ( $P \leq 0,05$ ). Cuando se requirió, se utilizó el test no paramétrico de Krustal Wallis para analizar diferencias entre los tratamientos.

### 3.6. Determinación de los parámetros fisicoquímicos de los suelos agrícolas

Para las muestras de suelo de los campos correspondientes a la campaña 2014-2015 y 2015-2016 se determinó la granulometría mediante un analizador de partículas por difracción láser. Además, se realizó la medición de pH utilizando la técnica de Potenciometría 1/2,5, medición de materia orgánica por el método Walkley – Black (1934) y la medición de nitrógeno total con el método de Kjeldahl (1883). Las diferencias entre los valores medios de los diferentes parámetros se evaluaron mediante el método Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ).

### 3.7. Identificación molecular del patógeno responsable de causar el carbón del maní

#### 3.7.1. Aislamiento de *Thecaphora frezii* a partir de muestras de granos infectados

Las muestras conteniendo *Thecaphora frezii* fueron extraídas de granos infectados (carbonosos) procedentes de los ensayos a campo de las campañas 2014-2015 y 2015-2016, realizados en la localidad de General Cabrera (Córdoba).

Para la desinfección de las teliosporas, se pesaron 10 mg de material carbonoso procedente de semillas infectadas, se les agregó 1 ml de etanol al 70% v/v y la muestra se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó 1 ml de solución de hipoclorito de sodio al 5% v/v, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 10.000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. Para finalizar, se agregó 1 ml de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente el tubo durante 1 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante. Este proceso de lavado con agua destilada estéril se repitió hasta completar 3 enjuagues. Las muestras de teliosporas estériles se almacenaron a 4°C.

#### 3.7.2. Extracción de ADN de teliosporas y amplificación por PCR de la región D1/D2

Las muestras de teliosporas desinfectadas superficialmente se molieron con nitrógeno líquido en un mortero, se distribuyeron en tubos estériles de 1,5 ml y se almacenaron a -20°C. El ADN total se extrajo a partir de las teliosporas siguiendo el protocolo descrito por Leslie y Summerell (2006), este protocolo se detalla a continuación para la extracción del ADN de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636. La integridad del ADN genómico fue analizada en un gel de agarosa 0,8% p/v teñido con bromuro de etidio, además se determinó la concentración de ADN por mediciones de absorbancia a 260 nm utilizando un NANO DROP 2000 (Thermo Scientific). Para la amplificación de la secuencia D1/D2, se utilizaron los cebadores D1/D2-NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1993), que permiten la amplificación de un fragmento (D1/D2) de cerca de 650 pb, correspondiente a una región parcial de la subunidad ribosomal mayor (ADNr

28S). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l y la mezcla de reacción contenía entre 1 y 2 ng /  $\mu$ l de ADN genómico, 1X de Buffer de PCR (Invitrogen), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada cebador, 1,25 U de *Taq Platinum* (Invitrogen) y 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de albúmina sérica bovina (New England, BioLabs). Las condiciones de la reacción fueron una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguida de 29 ciclos de 94°C durante 1 min, 49°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, por último una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio. Los productos de PCR se enviaron a Macrogen (Corea) para ser secuenciados.

### **3.8. Caracterización genotípica y fenotípica de la cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636**

#### **3.8.1. Caracterización genotípica**

##### **3.8.1.1. Producción de la biomasa fúngica**

La cepa de *Trichoderma* crecida en el medio de cultivo MEA o APG, fueron inoculadas en 50 ml de medio caldo papa glucosado al 50% v/v con 500 mg/l de cloranfenicol. Luego, se incubó a temperatura ambiente a 150 rpm por 3 días. Posteriormente, el micelio se filtró por vacío, se lavó con agua destilada estéril, se envolvió en papel aluminio y se guardó a -20°C.

El micelio extraído se molió con un mortero con ayuda de  $N_2$  líquido y se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml, colocando aproximadamente entre 1,5 a 2 g de micelio molido por tubo. El micelio molido fue guardado a -20°C.

##### **3.8.1.2. Extracción de ADN**

Se agregó por cada tubo con el micelio molido 700  $\mu$ l de solución de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% p/v, calentada previamente a 65°C y 15  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol. Se agitó el tubo vigorosamente por 2 min y se incubó 15 min a 65°C. Se

agregó entre 400 a 600  $\mu\text{l}$  de una solución de cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v) y se agitó la mezcla por 1 min para homogenizar las fase acuosa y orgánica. Luego, se centrifugó (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) a 12.000 rpm por 10 min para separar la fase acuosa de la orgánica. Después, se tomó 600  $\mu\text{l}$ , evitando tocar la interfase y se trasvaso hacia un nuevo tubo. Seguidamente se agregó, igual volumen de entre 400 a 600  $\mu\text{l}$  que el paso anterior, de isopropanol y 200 a 300  $\mu\text{l}$  (la mitad del volumen de isopropanol) de acetato de amonio 7,5 M. Se mezcló el tubo por inversión, varias veces. Posteriormente se centrifugo el tubo a 10.000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Más tarde se agregó 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% v/v y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el ADN por 5 min. Por último, se resuspendió el pellet de ADN en 100  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora TE 1X (Leslie y Summerell, 2006). La integridad del ADN genómico fue analizada en un gel de agarosa 0,8% p/v teñido con bromuro de etidio, además se determinó la concentración de ADN por mediciones de absorbancia a 260 nm utilizando un NANO DROP 2000 (Thermo Scientific). Finalmente, las muestras de ADN fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8.1.3. Amplificación de las secuencias TEF-1 $\alpha$ (Factor de elongación de la traducción 1 alfa) y CAL (calmodulina) de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636**

El ADN genómico de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 se utilizó como molde durante las amplificaciones por PCR con los cebadores EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) / EF1-986R (TACTTGAAGGAACCCTTACC) para el factor de elongación de la traducción 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) y los cebadores CAL-228F (GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC)/CAL-737R (3CATCTTTCTGGCCATCATGG) para el gen de la calmodulina (CAL). El protocolo utilizado para la amplificación fue el siguiente: las mezclas de PCR (20  $\mu\text{l}$ ) contenían 0,5  $\mu\text{M}$  de cada primer, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, Buffer PCR 1 X con  $\text{MgCl}_2$  2mM, 0,5 U de Taq polimerasa y 10  $\mu\text{l}$  de la solución de ADN genómico (0,2-0,5 ng/ $\mu\text{l}$ ). Las amplificaciones se realizaron en un Termociclador PCR MJ Research programado para una desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 8 min, seguida de 35 ciclos de 95, 58 (TEF-1 $\alpha$ ), 55 (CAL) y  $72^{\circ}\text{C}$  durante 15, 20 y 60 s, respectivamente, con una extensión de 5 min a  $72^{\circ}\text{C}$  en el ciclo final. Los productos de PCR de un tamaño aproximado 350 pb (TEF-1 $\alpha$ ) y 500 pb (CAL) se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% p/v y se tiñeron con bromuro de etidio (Carbone y Kohn, 1999). Las

reacciones de PCR y las secuenciaciones fueron realizadas por la empresa Macrogen (Corea).

### **3.8.2. Evaluación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 como potencial endófito en plantas de maní**

#### **3.8.2.1. Material vegetal**

Maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Granoleico.

#### **3.8.2.2. Preparación del inóculo de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636**

El inóculo de *T. harzianum* ITEM 3636 se obtuvo de la misma forma a la expuesta anteriormente en la sección 3.3.2. De igual manera, los tratamientos peleteado y control se generaron del mismo modo que para los ensayos anteriores, como se observa en la sección 3.3. Para este ensayo se utilizaron semillas de maní sin curar y sin desinfección superficial.

#### **3.8.2.3. Ensayo en invernadero**

Este ensayo se realizó para obtener las raíces que luego fueron evaluadas para determinar el posible comportamiento endófito de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636. El ensayo fue realizado del mismo modo al descrito en la sección 3.3.4. Los tratamientos fueron:

- Inoculación por peleteado en la semilla con *T. harzianum* ITEM 3636.
- Tratamiento con agua destilada estéril (control).

Las macetas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (aproximadamente 30-35°C durante el día y 15-20°C durante la noche). Las plantas se regaron cada tres días y se extrajo el material vegetal a los 30 y 120 días post-siembra.



## 3.8.2.4. Procesamiento del material vegetal

Las raíces se desinfectaron siguiendo el protocolo de Pimentel *et al.* (2006). Las muestras de raíz se lavaron con agua destilada y luego se desinfectaron superficialmente por inmersión durante 1 minuto en etanol al 70% v/v, 4 minutos en hipoclorito de sodio al 3% v/v y 30 segundos en etanol al 70% v/v. Luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por un lapso de tiempo de 1 min por lavado. Después de la desinfección superficial, las muestras se cortaron con un bisturí estéril en trozos de 5-7 mm y se transfirieron asépticamente a placas que contenían medio GVSM, que es selectivo para *Trichoderma*. Además se realizó la siembra con espátula de Drigalsky de la dilución 1/10 del soporte utilizado en el estudio, como así también se incubaron en las placas de Petri las raíces no desinfectadas, ambos casos se utilizaron como controles. Las placas se incubaron a 25°C con periodos de 12 horas de luz/oscuridad y se realizó una observación periódica por el lapso de una semana desde la siembra. Las muestras de raíces fueron tomadas de las plantas crecidas en el invernadero, de las cuales se tomaron 3 plantas de cada tratamiento a 30 y 120 días después de la siembra.

## 3.9. Estudio del impacto en la diversidad microbiana del suelo agrícola frente a la aplicación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636

### 3.9.1. Muestreo

Se tomaron muestras de suelo no rizosférico antes de la siembra, 75 días post-siembra (con plantas en estadio R2-R3; formación de ginóforos) y a 120 días post siembra. Las muestras tomadas antes de la siembra se recolectaron cubriendo completamente las superficies del ensayo, trazando dos transectas desde los vértices, donde se tomaron un mínimo de 15 muestras que fueron agrupadas por su proximidad para generar las 3 réplicas finales. Las muestras recolectadas a los 75 días post-siembra se tomaron a partir de cada uno de los sitios de donde se extrajo una planta de maní para el análisis de los parámetros de crecimiento, a continuación, las mismas se combinaron para generar las 3 réplicas finales. A los 120 días post siembra se tomaron entre 3 a 5 muestras (dependiendo el tamaño y la cantidad de surcos) para cubrir completamente cada parcela, luego se agruparon para generar las 3 réplicas finales. En todos los casos la

muestra final fue de aproximadamente 300 g de suelo que se depositaron en bolsas de polietileno y se conservaron a 4°C.

### 3.9.2. Nomenclatura de las muestras campaña 2014-2015

Las muestras de ADN fueron obtenidas a partir del muestreo de suelo correspondiente al ensayo a campo de la campaña 2014-2015 y las mismas fueron agrupadas de a 3 réplicas correspondientes a 3 parcelas diferentes, de los dos tratamientos (peleteado y control). También se agruparon en 3 réplicas las muestras tomadas antes de la siembra. Los tratamientos fueron: Control peleteado (CP) y Peleteado (P). Es decir, muestra 1, 2 y 3 tomadas antes de la siembra (denominadas como 1,2 y 3 Pre), muestras tomadas a los 75 días post siembra para los tres bloques (1, 2 y 3) de los dos tratamientos (CP<sub>1</sub>75d, CP<sub>2</sub>75d, CP<sub>3</sub>75d, P<sub>1</sub>75d, P<sub>2</sub>75d y P<sub>3</sub>75d,) y muestras tomadas a 120 días post siembra (CP<sub>1</sub>120d, CP<sub>2</sub>120d, CP<sub>3</sub>120d, P<sub>1</sub>120d, P<sub>2</sub>120d y P<sub>3</sub>120d).

### 3.9.3. Nomenclatura de las muestras campañas 2015-2016

Las muestras de suelo fueron recolectadas en los mismos campos en donde se llevaron adelante los ensayos de promoción de crecimiento/rendimiento y biocontrol del carbón de maní. Siendo uno de ellos el campo de la zona de General Cabrera y el otro el campo sin historial de carbón de maní en la zona de Cuatro Vientos dentro la misma campaña. Al igual que el muestreo anterior las muestras fueron tomadas en tres estadios de tiempo diferentes (pre siembra, 75 días post siembra y 120 días post siembra), aunque en estos ensayos se incorporó la inoculación en surco con la cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM3636. Es decir, los tratamientos fueron: Control Peleteado (CP), Peleteado (P), Control Surco (CS) e Inoculación en Surco (S).

### 3.9.4. Estudio de la diversidad microbiana del suelo agrícola por técnicas moleculares

#### 3.9.4.1. Extracción de ADN de muestras de suelo de campo

Para realizar la extracción de ADN a partir de las muestras de suelo recolectadas se utilizó el kit comercial Powersoil DNA isolation Kit (Mo Bio) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se pesaron 250 mg de tierra en cada tubo PowerBead (Provisto en el kit comercial) y se agitó levemente. Luego se agregaron 60  $\mu$ l de la solución C1 (provista en el kit) a cada tubo, se mezcló por inversión varias veces y luego se continuó con un paso de agitación vigorosa por 10 min. Después se centrifugó a 10.000 g por 30 s a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo (provisto en el kit). A continuación se agregó 250  $\mu$ l de solución C2 (provista por el kit), se agitó vigorosamente por 5 s y se incubó a 4°C por 5 min. Posteriormente se centrifugó por 1 min a 10.000 g y se transfirieron 600  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo nuevo (provisto por el kit). En el siguiente paso, se agregaron 200  $\mu$ l de solución C3 (provista en el kit) y se incubó por 5 min a 4°C. Se centrifugó por 1 min a 10.000 g a temperatura ambiente. Luego, se transfirieron 750  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo nuevo (provisto por el kit) y se agregó 1,2 ml de solución C4 (provisto por el kit) y se agitó por 5 s. Posteriormente se transfirieron 675  $\mu$ l de la muestra en el Spin Filter (provisto por el kit) y se centrifugó a 10.000 g por 1 min a temperatura ambiente. Se descartó todo el líquido que no se retuvo en el filtro y se añadieron nuevamente 675  $\mu$ l de la muestra en el Spin Filter, se centrifugó a 10.000 g por 1 min a temperatura ambiente y se descartó el líquido que no se retuvo en el filtro. A continuación, se cargó el remanente de muestra en el Spin Filter, se centrifugó a 10.000 g por 1 min a temperatura ambiente y se procedió a descartar el líquido que no se retuvo en el filtro. Luego, se agregaron 500  $\mu$ l de la solución C5 al Spin Filter, se centrifugó a 10.000 g por 30 s a temperatura ambiente y se descartó la solución remanente que no se retuvo en el filtro. Después, se centrifugó a 10.000 g por 1 min a temperatura ambiente. Por último, el Spin Filter se transfirió a un nuevo tubo (provisto), se agregó 100  $\mu$ l de solución C6 y se centrifugó a 10.000 g por 30 s a temperatura ambiente. Se descartó el Spin Filter, seguidamente se determinó la concentración de ADN por mediciones de absorbancia a 260 nm con el equipo NANO DROP 2000 (Thermo Scientific) y finalmente la muestra de ADN se guardó a -20°C.

## 3.9.4.2. PCR-Electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE)

### 3.9.4.2.1. Amplificación del marcador molecular bacteriano

Para la amplificación parcial de los genes ribosomales 16S se realizó una nested PCR. En la primera reacción de amplificación se utilizaron los cebadores 27F y R534 generando un fragmento de aprox. 500 pb. La mezcla de la primera reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l y contenía buffer Taq polimerasa 1X (Promega) con 1,5mM de  $MgCl_2$ , enzima Go Taq (Promega) 1,5U, dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, dNTPs (Promega) 0,2 mM, albumina sérica bovina (Fermentas) 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, cebadores directo 27F y reverso R534 0,2  $\mu$ M de cada uno (Tabla 2) y se agregó 0,5 a 2 ng de cada muestra de ADN. El volumen final se completó con agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 45 s de anillado a 55°C y 45 s de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

El producto generado fue utilizado como templado para la segunda amplificación con los primers GC-F341 y R534 que flanquean un fragmento de 233 pb del dominio V3 del ADN/ARNr 16S. La segunda reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40  $\mu$ l y contenía buffer Taq polimerasa 1X (Promega) con 1,5mM de  $MgCl_2$ , enzima Go Taq (Promega) 2,4U, dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, dNTPs (Promega) 0,2 mM, albumina sérica bovina (Fermentas) 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, cebadores directo F341-GC y reverso R351 0,2  $\mu$ M de cada uno (Tabla 2) y se agregó 0,5  $\mu$ l de producto de PCR de la primer reacción. El volumen final se completó con agua destilada estéril. Las condiciones del programa de amplificación fueron las mismas que para la reacción mencionada anteriormente. Para todas las reacciones, los productos de PCR fueron examinados en gel de agarosa 1% p/v teñido con Gel red Nucleid Acid Stain 10000X (Biotium) y visualizado con transiluminador TM 26 (Labnet). Además, fueron realizadas con un termociclador MULTIGENE GRADIENT TC 9600 (Labnet).

### 3.9.4.2.2. Amplificación del marcador molecular de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) de la subdivisión $\beta$ del Filo *Proteobacteria*

Para la amplificación de los genes ribosomales 16S se realizó una PCR anidada o nested PCR debido a la baja abundancia de las BOA en muestras ambientales (Ward *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2007). En la primera amplificación se utilizaron

los cebadores CTO F189 y R654 que amplifican una región conservada de 429 pb ubicada entre los dominios variables V2 y V3 del gen del ARNr 16S presentes en la  $\beta$ -subdivisión del Filo Proteobacterias de las bacterias oxidantes del amoníaco. La primer reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l y contenía buffer Taq polimerasa 1X (Promega) con 1,5mM de  $MgCl_2$ , enzima Go Taq (Promega) 1,5 U, dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, dNTPs (Promega) 0,2 mM, albumina sérica bovina (Fermentas) 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, cebadores directo CTO F189 y reverso CTO R654 0,2  $\mu$ M de cada uno (Tabla 2) y se agregó 5  $\mu$ l de cada muestra diluidas al medio. El volumen final se completó con agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 45 s de anillado a 55°C y 45 s de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

El producto generado fue utilizado como templado para la segunda amplificación con los cebadores GC-F341 y R534 que flanquean un fragmento de 233 pb del dominio V3 del ADN/ARNr 16S. La segunda reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40  $\mu$ l y contenía buffer Taq polimerasa 1X (Promega) con 1,5mM de  $MgCl_2$ , enzima Go Taq (Promega) 0,625 U, dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, dNTPs (Promega) 0,2 mM, albumina sérica bovina (Fermentas) 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, cebadores directo GC-F341 y reverso R351 0,1  $\mu$ M de cada uno (Tabla 2) y se agregó 1,5  $\mu$ l de cada producto de PCR de la primer reacción. El volumen final se completó con agua destilada estéril. Las condiciones del programa de amplificación fueron las mismas que para la reacción mencionada anteriormente.

### **3.9.4.2.3. Amplificación del marcador molecular fúngico**

Para la amplificación de las regiones ITS se utilizó una PCR anidada o Nested PCR. En la primera reacción se obtuvo un fragmento de aprox. 700 pb. La mezcla de la primera reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l y contenía buffer Taq polimerasa 1X (Promega) con 1,5mM de  $MgCl_2$ , enzima Go Taq (Promega) 1,25U, dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, dNTPs (Promega) 0,2 mM, albumina sérica bovina (Fermentas) 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, cebadores directo ITS1-F y reverso ITS4 0,2  $\mu$ M de cada uno (Tabla 2) y se agregó 0,5 a 2 ng de cada muestra de ADN. El volumen final se completó con agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 31 ciclos con 45 s a 94°C, 58°C durante 45 s y 72 °C durante 45 s. Además de un paso de extensión final de 7 min a 72°C.

## Materiales y métodos

El producto generado fue utilizado como templado para la segunda amplificación con los cebadores ITS1F-GC e ITS2 (Tabla 2) que flanquean un fragmento de aprox. 300 pb. La segunda reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40  $\mu$ l y contenía buffer Taq polimerasa 1X (Promega) con 1,5mM de  $MgCl_2$ , enzima Go Taq (Promega) 2U, dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, dNTPs (Promega) 0,2 mM, albúmina sérica bovina (Fermentas) 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, cebadores directo ITS1F-GC y reverso ITS2 0,2  $\mu$ M de cada uno y se agregó 2  $\mu$ l de cada producto de PCR de la primer reacción. El volumen final se completó con agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 10 ciclos de 30 s a 94°C, la

**Tabla 2:** Cebadores utilizados para la amplificación de los marcadores moleculares en el estudio por PCR-DGGE.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Referencia
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Grifoni <i>et al.</i> (1995)
341F-GC	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)  Kowalchuk  <i>et al.</i> , (1997)
FCTO189	GGAGAAAGYAGGGGATCG	<i>et al.</i> , (1997)  Kowalchuk  <i>et al.</i> , (1997)
RCTO654	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes y Bruns (1993); Pereira <i>et al.</i> (2010)
ITS1F-GC	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGGCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA	White <i>et al.</i> (1990), Anderson <i>et al.</i> (2003a, b)
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> (1990), Anderson <i>et al.</i> (2003a, b)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> (1990)

temperatura de anillado comenzó a 65°C durante 30 s y fue disminuyendo de a 1°C en el transcurso de los 10 ciclos y la extensión fue a 72 °C durante 30 s. Además, se realizaron 25 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de anillado a 50°C y 30 s de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 7 min a 72°C.

### **3.9.4.2.4. Preparación de geles y condiciones de electroforesis**

Los geles fueron realizados utilizando un generador de gradiente SG15 (Amersham Biosciences) y una bomba peristáltica DYNAMAX RP1 (Rainin). Se prepararon geles de poliacrilamida 8% conteniendo un gradiente lineal desnaturalizante de 40 a 70% para analizar las muestras de bacterias totales, 35 a 65 % para las bacterias oxidantes del amoníaco y 30 a 60% para analizar hongos totales (donde el 100% desnaturalizante contiene urea 7M y formamida 40% v/v). Por calle se sembraron 42 µl del producto de amplificación, el cual contenía 4 µl de buffer de siembra 6X (Biodynamics).

Las muestras en los diferentes geles fueron corridas a 60V (entre 23 a 25 mA) con una fuente de energía PowerPac Basic (BIO-RAD) durante 17 h y mantenidas a 60°C con un baño termostatzado A100 (Vicking) en buffer TAE 1X. Los geles fueron teñidos en 100 ml de buffer TAE 1X con 20 µl GelRed Nucleic Acid Stain 10000X (Biotium) durante 45 min, lavados en agua destilada durante 10 min y visualizados en transiluminador UV LABNET (Biodynamics).

### **3.9.4.2.5. Análisis de imágenes de los perfiles DGGE**

Los perfiles DGGE fueron digitalizados y analizados con el software GELCOMPARE II versión 4.602 (Applied Maths). La posición y la intensidad de las bandas (previamente normalizadas) fueron volcadas en una matriz de bandas que fue utilizada como material de partida para el análisis de agrupamiento o conglomerados y el cálculo de diversidad de las muestras. En este trabajo se evaluó la similitud de la estructura de las comunidades de bacterias totales, BOA y hongos totales entre los distintos tratamientos teniendo en cuenta los perfiles de bandas de cada muestra en el DGGE.

## 3.9.4.2.6. Determinación de la diversidad microbiana del suelo

Para estimar la diversidad de la comunidad a partir de la matriz de intensidades de bandas del DGGE, cada banda en el gel es definida como un filotipo específico o especie y la intensidad de cada banda detectada es considerada la abundancia de ese filotipo específico (Escalante, 2007; Zheng *et al.*, 2008).

Cada matriz de bandas se analizó con el programa PAST versión 2.17b (Hammer *et al.*, 2001) para el cálculo de los índices de Simpson (D) (Simpson, 1949) y Shannon-Weaver (H') (Shannon y Weaver, 1949) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$D_{sim} = \sum_{i=1}^S \left( \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right)$$

Dónde:

S es el número de especies o filotipos,  $n_i$  la abundancia de una determinada especie o filotipo  $i$  e N es la abundancia total de las especies o filotipos. Este índice toma en cuenta el número de especies y la abundancia de cada especie. Además, representa la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra pertenezcan a la misma especie o categoría. El rango del índice varía entre 0 y 1; 0 representa diversidad infinita y 1 representa que no hay diversidad alguna en la muestra. Debido a la incomodidad de interpretación de este índice, surge entonces índice de diversidad de Simpson (1-D) y el índice recíproco Simpson (1 / D) en dónde, a mayores valores de los mismos, mayor será la diversidad y de este modo se genera una interpretación más lógica.

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln N_i/N$$

Dónde:

$N_i$  es la abundancia del filotipo  $i$ , N es el total de la abundancia de todos los filotipos en la muestra, S es el número de filotipos (Zheng *et al.*, 2008) y  $N_i/N$  es la probabilidad de importancia de cada filotipo o especie (Lynch *et al.*, 2004). De esta manera, H' toma en cuenta ambos componentes de diversidad: riqueza y equitatividad.



### 3.9.4.2.7. Análisis estadístico de los datos obtenidos del estudio de PCR-DGGE

El análisis de los valores medios de los índices de Shannon y Simpson de los tratamientos fue realizado con ANAVA y las diferencias entre las medias fueron calculadas mediante la prueba de comparación de medias de LSD Fisher con significancias del 5% ( $p < 0,05$ ) con el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2014).

### 3.9.4.3. Estudio de secuenciación masiva de amplicones de una región parcial del gen del ARNr 16S y del espaciador de transcritos intergénicos (ITS)

#### 3.9.4.3.1. Nomenclatura de las muestras

Las muestras de ADN fueron las mismas que las utilizadas para el experimento de PCR-DGGE correspondientes a los campos de las campañas 2014-2015 y 2015-2016, ambos realizados en la zona de General Cabrera, Córdoba (Argentina). Las muestras se agruparon de a 2 réplicas correspondientes a 2 parcelas para los tratamientos Control peleteado (CP) y Peleteado (P) a los 120 días post siembra. También se agruparon en 2 réplicas las muestras tomadas antes de la siembra. Es decir muestras I4501, I4502, I5601 e I5602 tomadas antes de la siembra (Siendo I: Condición Inicial; 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente; 01 y 02 corresponden a las réplicas) y muestras tomadas a los 120 días post siembra C4501, C4502, C5601, C5602, Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602 (Siendo C: tratamiento control peleteado, Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636; y los números representan lo mismo que las muestras tomadas antes de la siembra). Se determinó la concentración de ADN por mediciones de absorbancia a 260 nm utilizando un NANO DROP 2000 (Thermo Scientific).

Las muestras se liofilizaron y se enviaron a la empresa CD Genomics (USA) para realizar el estudio.

#### 3.9.4.3.2. Secuenciación y análisis de secuencias

El experimento consistió en la extracción de ADN de muestras de suelo, amplificación por PCR para la obtención de marcadores moleculares filogenéticos, purificación,

construcción de librerías de ADN, secuenciación y análisis de las secuencias. Para estudiar la diversidad microbiana de bacterias y hongos se utilizaron los cebadores 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')- 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') que amplifican regiones hiper variables V3 y V4 del gen del ARN ribosomal 16S y los cebadores ITS1f(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')- ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') que amplifica la región ITS1 que está entre los genes de los ARNr 18S y 5,8S, respectivamente.

La secuenciación fue realizada con el equipo HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA) para generar lecturas crudas de extremos apareados (paired-end). Las lecturas crudas de extremos apareados se asignaron a cada muestra basándose en sus códigos de barras específicos, que luego se eliminaron junto con los adaptadores. Las lecturas de extremos apareados se fusionaron mediante el programa FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) y las secuencias empalmadas obtenidas se denominaron etiquetas crudas (raw tags). La depuración de las etiquetas crudas se realizó utilizando el software Trimmomatic v0.33 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), que lleva a cabo un proceso de control de calidad. Luego de la depuración, se obtuvieron etiquetas limpias de alta calidad. A continuación, las etiquetas fueron comparadas con la base de datos de referencia (Gold database, [http://drive5.com/uchime/uchime\\_download.html](http://drive5.com/uchime/uchime_download.html)) utilizando el algoritmo UCHIME (Algoritmo UCHIME, [http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime\\_algo.html](http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html)) para detectar las secuencias quiméricas, que fueron eliminadas y así se obtuvieron las etiquetas efectivas (Tablas 9 y 12 de la sección Resultados).

Las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU por sus siglas en inglés), son grupos de secuencia similares de los genes marcadores 16S ARNr e ITS. Cada uno de estos grupos representó una unidad taxonómica de una especie o género de bacteria u hongo dependiendo del umbral de similitud de secuencia. Los grupos de OTUs se definieron por un umbral de identidad del 97%. A partir de cada grupo OTU se selecciona una secuencia única como secuencia representativa. La secuencia representativa se anota utilizando un método de clasificación y todas las secuencias dentro de ese OTU heredan esa misma clasificación. Se utilizó UCLUST (Caporaso *et. al*, 2010) en QIIME (Edgar, 2010) (versión 1.8.0) para agrupar las etiquetas con un 97% de similitud en OTUs, las cuales, luego fueron anotados basados en la base de datos taxonómica de Silva (bacterias) UNITE (hongos). Las OTUs que se anotaron como mitocondrias, cloroplastos y desconocidas fueron eliminadas. La información de abundancia en cada nivel taxonómico se generó utilizando QIIME, los gráficos de la estructura de la comunidad microbiana de cada nivel, mapas de calor, UPGMA, y análisis de coordenadas y

componentes principales se realizaron con la herramienta de lenguaje R versión 3.5.0. Los dendrogramas se calcularon utilizando el algoritmo de encadenamiento promedio o Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) es un tipo de método de agrupación jerárquica utilizando una vinculación media.

### **3.9.4.3.3. Análisis estadístico de los datos obtenidos del estudio de secuenciación masiva de amplicones**

Se aplicó el método del Efecto del tamaño sobre el análisis de línea discriminante (LEfSe por sus siglas en inglés. Segata *et al.*, 2011) y METASTAT (White *et al.*, 2009). El método LEfSe se basa en la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, con un paso adicional para estimar el tamaño de efecto para la identificación de biomarcadores de alta dimensión, este método permite explicar las características genómicas (genes, vías o taxones) y caracteriza las diferencias entre dos o más condiciones (o clases) biológicas. El criterio de selección utilizado para observar diferencias en los biomarcadores es un puntaje  $LDA > 4$ . El método METASTAT usa pruebas T (T-test, por sus siglas en inglés) con permutación de muestra para detectar características diferencialmente abundantes en un metagenoma, es una prueba no paramétrica que determina si hay taxones que están representados diferencialmente entre las muestras ( $P < 0,05$ ).

Por otro lado, se hizo un análisis estadístico multivariado que incluyó un análisis ANOVA y un test de Wilcoxon. El análisis de ANOVA se utilizó para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos y fue hecho para los diversos niveles taxonómicos ( $P < 0,05$ ). El test de Wilcoxon es una prueba de hipótesis estadística no paramétrica utilizada cuando se comparan dos muestras relacionadas para evaluar si sus rangos de población promedio difieren ( $P < 0,05$ ). Las diferencias entre los valores medios de los índices de alfa diversidad se evaluaron mediante el método de Holm-Sidak ( $P < 005$ ).

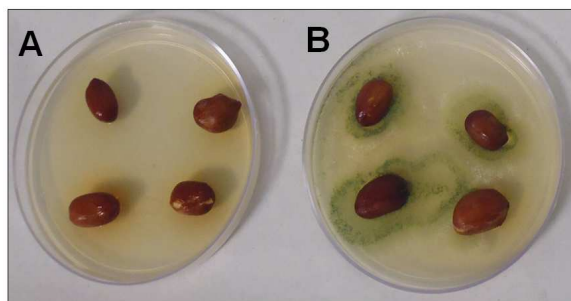
### **3.9.4.3.4. Publicación en la base de datos de las secuencias obtenidas del estudio de secuenciación masiva de amplicones**

Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del Archivo de Lectura de Secuencia (SRA) del NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database) con número de acceso SRP146071 y ya se encuentran disponibles.

## 4. Resultados

### 4.1. Tolerancia de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 al curasemilla

Para evaluar el efecto del curasemilla sobre la cepa de *Trichoderma* se realizó un análisis cualitativo para saber si el fungicida inhibía el crecimiento del biocontrolador. Como se puede observar en la Figura 7B, si bien la cepa no crece sobre las semillas, lo logra hacer en el medio.



**Figura 7:** Tolerancia de *T. harzianum* ITEM 3636 al fungicida comercial Options Advance (NOVA).

A: Semillas desinfectadas, posteriormente recubiertas con el fungicida y peleteadas con Carboximetil celulosa y agua destilada estéril (Control). B: Semillas desinfectadas, posteriormente recubiertas con el fungicida y peleteadas con Carboximetil celulosa y con la cepa ITEM 3636.

Por otra parte se evaluó la viabilidad de los conidios en presencia del fungicida, para ello se utilizaron semillas con y sin fungicida. Como se puede observar en la Tabla 3, los conidios del hongo, en presencia del fungicida, se mantienen por el lapso de una semana con una viabilidad similar a la alcanzada por el tratamiento control (sin fungicida).

**Tabla 3:** Viabilidad de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 en presencia y ausencia del curasemillas.

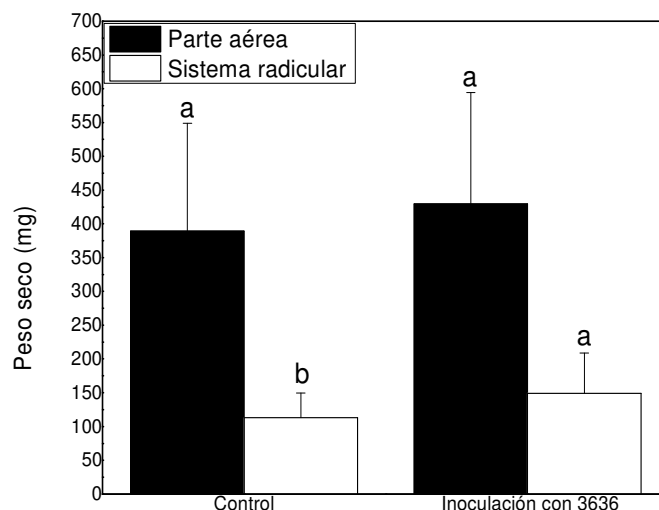
Tratamientos	Recuento (UFC/ml) por días		
	0	3	7
Control	1,6E+05 <sup>a</sup>	2,2E+04 <sup>a</sup>	1,4E+04 <sup>a</sup>
Con fungicida	1,4E+05 <sup>a</sup>	2,3E+04 <sup>a</sup>	1,4E+04 <sup>a</sup>

Tratamiento: Control (Sin curasemillas y peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636) y Con fungicida (Con curasemillas y peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636). Los números 0,3 y 7 corresponden a los días en los que se realizó el recuento. Las mismas letras representan que no hubo diferencias estadísticamente significativas.

## 4.2. Efecto de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 sobre el crecimiento y rendimiento de maní

### 4.2.1. Ensayos en cámara de crecimiento

El efecto de la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 sobre la emergencia de plántulas se determinó a los 7 días, observándose un aumento notorio en el ensayo II; dicho incremento fue del 20% en la germinación de semillas inoculadas al momento de la siembra. En referencia a los parámetros de crecimiento de las plántulas a los 40 días post-siembra no se observaron diferencias significativas con los dos métodos de inoculación utilizados, excepto en la biomasa radicular (Fig. 8). Donde se determinó un incremento del 30%, en favor de las plantas inoculadas con la cepa. En la Figura 9 se observan plántulas de maní, inoculada y no inoculada (Control) con la cepa ITEM 3636.



**Figura 8:** Pesos aéreos y radiculares registrados a 40 días post siembra en cámara de crecimiento. Los valores representan los promedios registrados a partir de un experimento con 20 réplicas. Las diferentes letras reflejan las diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 9:** Plántulas de maní obtenidas en el ensayo en cámara de crecimiento. A: plántula control; B: plántula inoculada con *T. harzianum* ITEM 3636.

## 4.2.2. Ensayo en invernadero

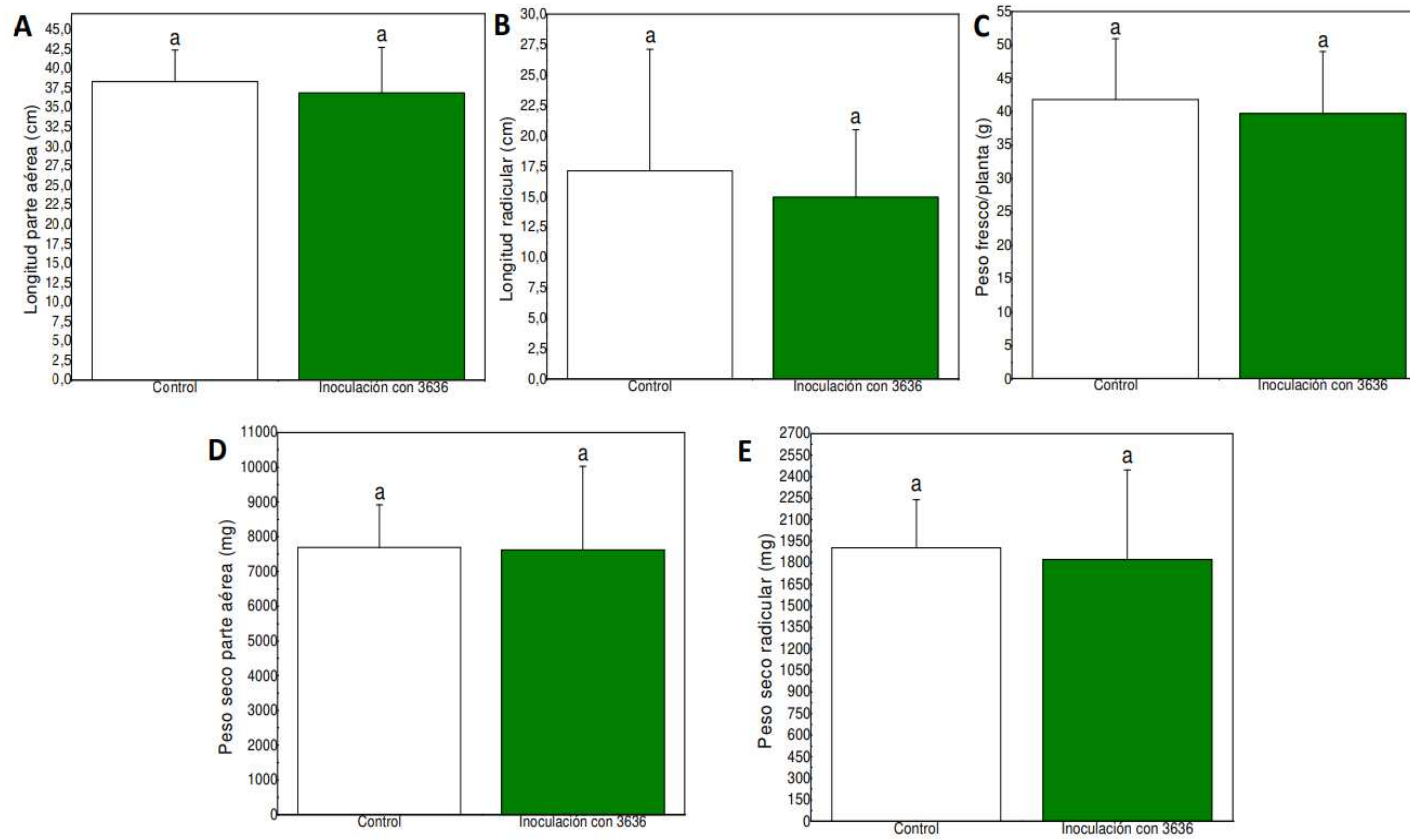
### 4.2.2.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra

A este tiempo se evaluó el efecto de la cepa de *Trichoderma* como promotor del crecimiento vegetal (Fig. 10). Para ello se determinó la longitud de la parte aérea de la planta, longitud radicular, peso fresco, peso seco parte aérea y peso seco radicular, en los diferentes tratamientos. Los datos revelaron que no hubo diferencias significativas entre las longitudes de las partes aéreas, en los respectivos tratamientos (Fig. 11A). Además, los datos evidenciaron que la inoculación redujo la longitud radicular de las plantas de maní, en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, las diferencias en este parámetro no resultaron significativas (Fig. 11B). El efecto de *T. harzianum* 3636 sobre el peso fresco de las plantas (g/planta) de maní a los 75 días de crecimiento se muestra en la Fig. 11C. Como puede observarse, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos. Los pesos secos de las partes aéreas (mg/planta) de maní a los 75 días post siembra no resultaron ser significativamente diferentes entre los tratamientos (Fig. 11D). Finalmente, los resultados del efecto de la inoculación con *T. harzianum* 3636 sobre el peso seco de las raíces (mg/planta) de maní a los 75 días post siembra evidenciaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Fig. 11E).



**Figura 10:** Plantas de maní obtenidas en el ensayo de invernadero a 75 días post siembra. Se encuentran los 2 tratamientos estudiados, por un lado el control y por el otro la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636.

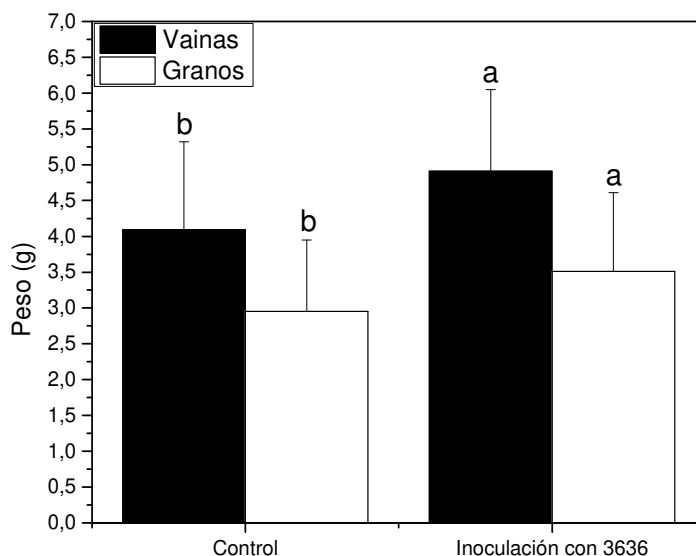
## Resultados



**Figura 11:** Parámetros de crecimiento de plantas de maní registrados a 75 días post siembra en el ensayo de invernadero. (A) Longitud partes aéreas. (B) Longitud radicular. (C) Peso fresco de cada planta. (D) Peso seco aéreo. (E) Peso seco radicular. Los valores representan los promedios registrados a partir de un experimento con 10 réplicas. Las letras idénticas corresponden a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.2.2. Mediciones de peso de vainas y granos a los 120 días post siembra

Los resultados indican que la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 causó incrementos del 20% en peso de vainas y del 19% en peso de granos, en comparación con el tratamiento control (Figura 12).



**Figura 12:** Peso de vainas (cajas) y granos de maní registrados a 120 días post siembra en el ensayo de invernadero. Los valores representan los promedios registrados a partir de un experimento con 10 réplicas. Las diferentes letras reflejan las diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.2.3. Colonización de la rizósfera de maní

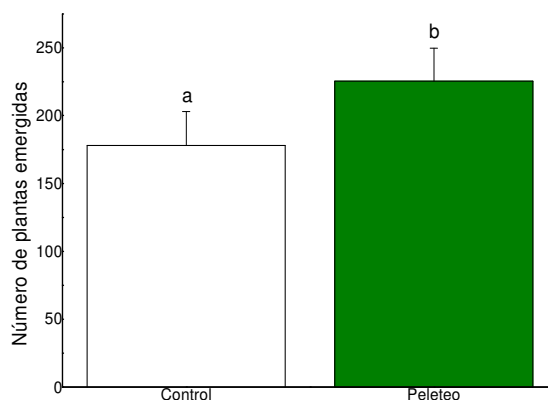
Se evaluó la supervivencia de la cepa *T. harzianum* ITEM 3636 en la rizósfera de maní a los 75 y a los 120 días de experimentación. Para ello se realizó un recuento en placa del suelo rizosférico de las plantas crecidas en condición de invernadero. A los 75 días post siembra se alcanzó un recuento de *Trichoderma* de  $4,6 \cdot 10^3$  UFC/g de suelo rizosférico. Sin embargo, a los 120 días, si bien se detectó la presencia de *Trichoderma*, la cantidad de colonias fue inferior al límite de conteo de 10-100 colonias.



### 4.2.3. Ensayos a campo

#### 4.2.3.1. Campaña 2014-2015

El efecto de la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 sobre la emergencia de plántulas se determinó a los 15 días post siembra. Las semillas peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636 (Figura 13) mostraron un incremento de aproximadamente 25% en la germinación, comparadas a las semillas del tratamiento control.

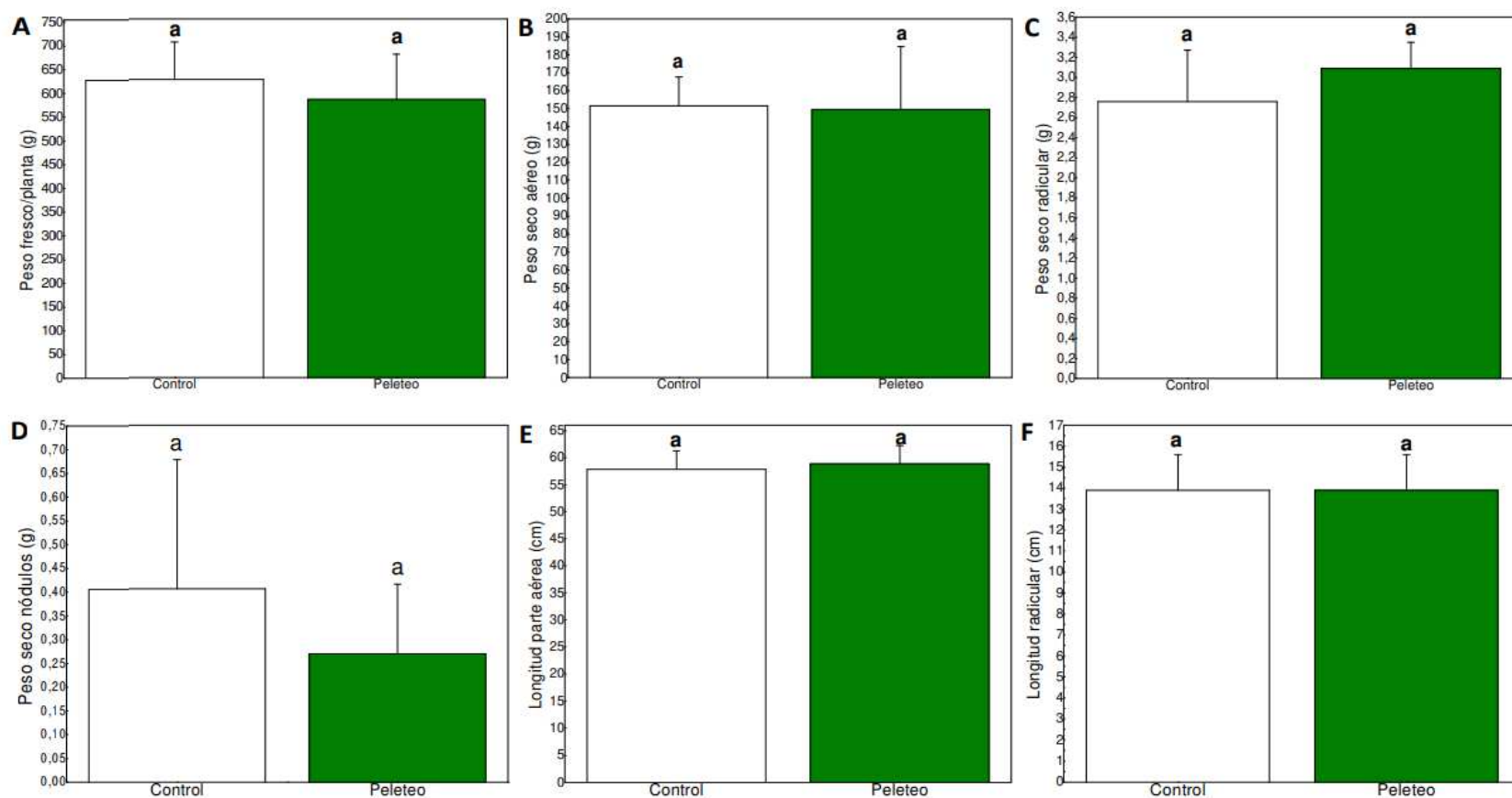


**Figura 13:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre el número de plantas de maní emergidas luego de 15 días post siembra en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015. Las diferentes letras reflejan las diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.1.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra

El efecto de *T. harzianum* ITEM 3636 fue evaluado sobre el peso fresco de las plantas, peso seco parte aérea, peso seco radicular, peso seco de nódulos, longitud parte aérea y longitud radicular a los 75 días post siembra. Luego de realizar el análisis de los resultados de las mediciones de todos los parámetros mencionados anteriormente (Figura 14) no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ninguno de ellos.

## Resultados

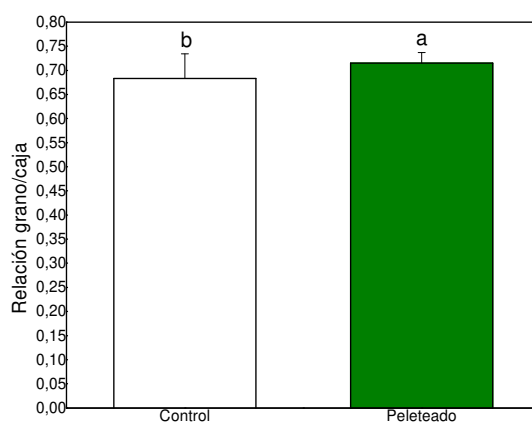


**Figura 14:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre los parámetros de crecimiento de las plantas de maní registrados a 75 días post siembra en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015. (A) Peso fresco. (B) Peso seco parte aérea. (C) Peso seco radicular. (D) Peso seco de nódulos. (E) Longitud parte aérea. (F) Longitud radicular. Las letras idénticas corresponden a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.1.2. Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)

##### 4.2.3.1.2.1. Relación grano/caja

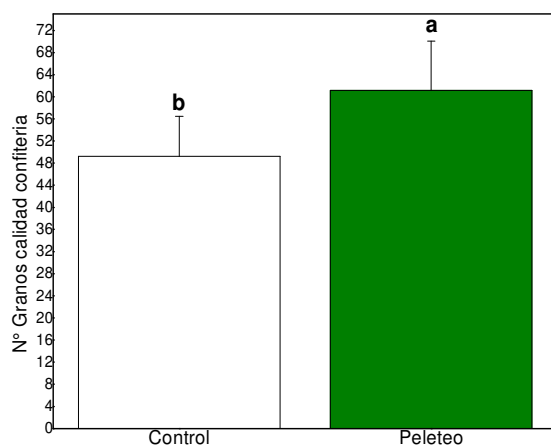
Dentro de los parámetros de rendimiento se evaluó qué proporción del peso de las cajas es propia de los granos, determinada como relación grano/caja. En las plantas del tratamiento de inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 se observó un incremento significativo en la relación grano/caja, en comparación con el tratamiento control. Dicho incremento fue de aproximadamente 5% (Fig. 15).



**Figura 15:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre la relación grano/caja por planta de maní registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

##### 4.2.3.1.2.2. Número de granos calidad confitería

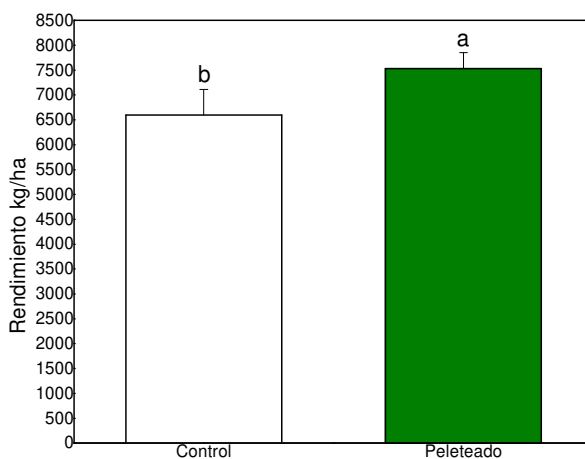
Uno de los parámetros que influyen en el precio del maní está asociado a la granulometría, siendo los granos calidad confitería (tamaño superior a zaranda 7,5 mm) los que poseen un mejor precio. La inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 produjo un incremento significativo en el número de granos de calidad confitería, en comparación con el tratamiento control. Dicho aumento fue en promedio de 12 granos calidad confitería por planta, o sea aproximadamente del 24% (Figura 16).



**Figura 16:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre el número de granos de maní calidad confitería registrados por planta a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015. Las diferentes letras reflejan las diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.1.2.3. Rendimiento de Kg de granos/ha

Uno de los parámetros que mayor información brinda sobre la producción de un cultivo es el rendimiento de la masa de granos obtenidos por hectárea (Kg/ha). El resultado obtenido (Figura 17) muestra que la inoculación con *T. harzianum* produjo un incremento significativo en el rendimiento de los granos por hectárea (Kg/ha), alcanzando un aumento de 14% con respecto al tratamiento control.



**Figura 17:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2014-2015. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

## **4.2.3.2. Campaña 2015-2016**

### **4.2.3.2.1. Ensayo a campo 1**

#### **4.2.3.2.1.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra**

El campo en donde se realizó el experimento se encuentra ubicado en la zona de la localidad de Cuatro Vientos y no posee historial de la enfermedad del carbón del maní. En este ensayo a campo se agregó la inoculación por riego de la cepa en el surco de siembra para evaluar otra posible forma de aplicación del biocontrolador. Al igual que lo observado en el ensayo a campo anterior (Figura 14), no se encontró diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de crecimiento vegetal medidos a los 75 días post siembra en esta campaña.

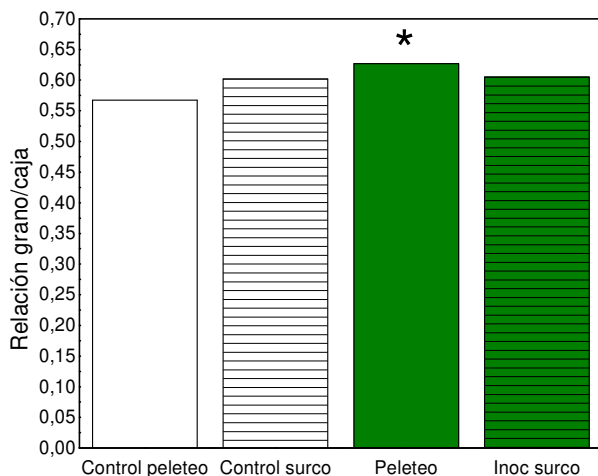
#### **4.2.3.2.1.2. Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)**

##### **4.2.3.2.1.2.1. Relación grano/caja**

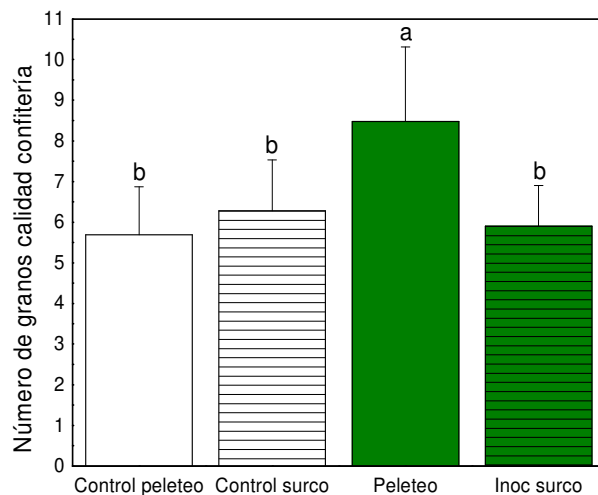
Los resultados evidencian que la inoculación de la cepa ITEM 3636 mediante peleteo de las semillas resultó en un incremento significativo en este parámetro medido a cosecha (120 días post siembra), en comparación con el resto de los tratamientos (Fig. 18).

##### **4.2.3.2.1.2.2. Número de granos calidad confitería**

Los resultados evidencian que la inoculación de la cepa ITEM 3636 mediante peleteo de semillas resultó en un incremento significativo en el número de granos calidad confitería/planta. Específicamente, se observó un incremento de entre 25 y 32% en el número de granos calidad confitería/planta en el tratamiento de inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 mediante peleteo, en comparación con los demás tratamientos.



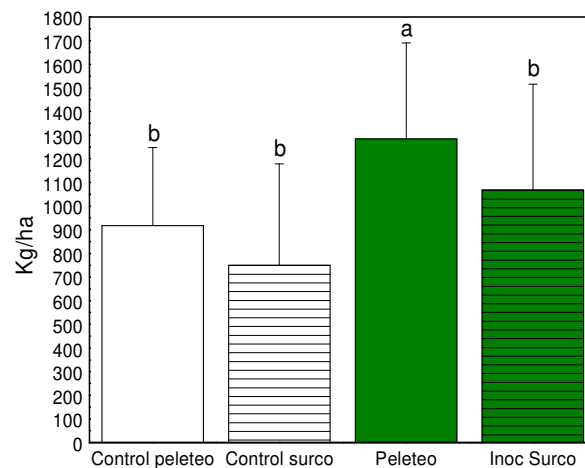
**Figura 18:** Efecto de la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre la relación grano/caja por planta de maní registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de Cuatro Vientos, campaña 2015-2016. (\*) Evidencia diferencias estadísticamente significativas. Se graficaron los valores de las Medianas. Se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.



**Figura 19:** Efecto de la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el número promedio de granos de maní calidad confitería por planta registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de Cuatro Vientos, campaña 2015-2016. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.2.1.2.3. Rendimiento de Kg de granos/ha

En este campo, la inoculación mediante peleteo de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 causó un incremento significativo en el rendimiento (Kg/ha) del cultivo, en comparación con los demás tratamientos (Figura 20). Más específicamente, dicho incremento fue del 40% en comparación con el control de peleteo. Por lo tanto, la inoculación de semillas de maní mediante peleteo con *T. harzianum* ITEM 3636 estimuló significativamente la producción de granos.



**Figura 20:** Efecto de la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de Cuatro Vientos, campaña 2015-2016. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.2.2. Ensayo a campo 2

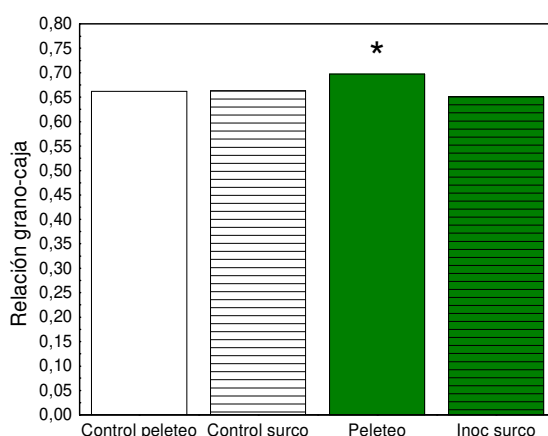
##### 4.2.3.2.2.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento a los 75 días post siembra

Este ensayo fue realizado en un campo con historial de carbón de maní, próximo a la localidad de General Cabrera. Al igual que en el ensayo a campo 1, de la misma campaña, se agregó el tratamiento de inoculación del biocontrolador en el surco de siembra. Del mismo modo que lo observado en los anteriores ensayos a campo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de crecimiento vegetal medidos a los 75 días post siembra.

#### 4.2.3.2.2. Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)

##### 4.2.3.2.2.1. Relación grano/caja

Los resultados que muestran el efecto del tratamiento de semillas de maní con *T. harzianum* ITEM 3636 sobre la relación grano/caja por planta se exponen en la Figura 21. Los mismos muestran que la inoculación con la cepa ITEM 3636 mediante peleteo de semillas resultó en un incremento significativo en este parámetro, en comparación con el resto de los tratamientos.

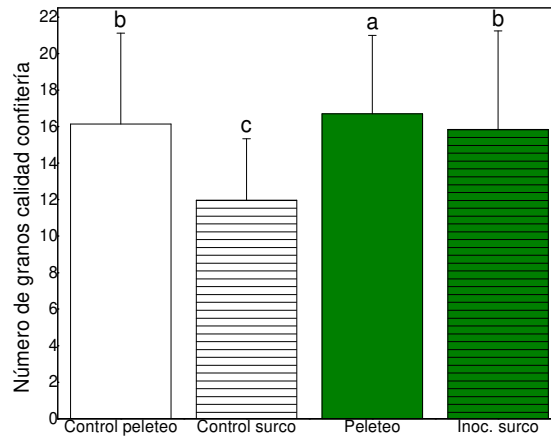


**Figura 21:** Efecto de la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre la relación grano/caja por planta de maní registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2015-2016. (\*) Evidencia diferencias estadísticamente significativas. Se graficaron los valores de las Medianas. Se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.

##### 4.2.3.2.2.2. Número de granos calidad confitería

El efecto del tratamiento de semillas de maní con *T. harzianum* ITEM 3636 sobre el número de granos calidad confitería por planta es representado en la Figura 22. Los resultados evidencian que la inoculación de la cepa ITEM 3636 mediante peleteo de las semillas resultó en un incremento significativo en este parámetro medido a cosecha (120 días post siembra), en comparación con el resto de los tratamientos.

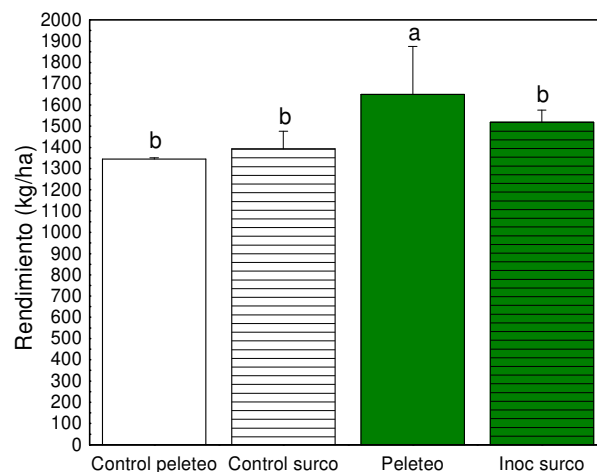




**Figura 22:** Efecto de la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el número de granos de maní calidad confitería registrados por planta a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2015-2016. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas. Se graficaron los valores de las Medias. Se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.

#### 4.2.3.2.2.3. Rendimiento de Kg de granos/ha

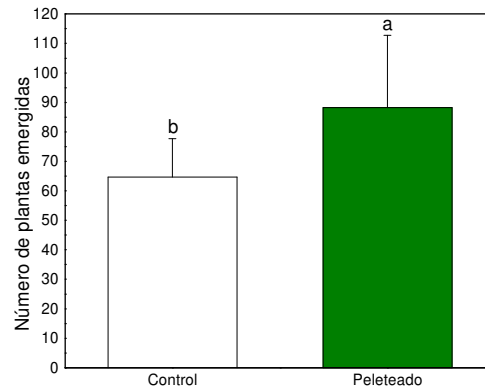
Los resultados en este ensayo a campo demostraron que la inoculación con la suspensión de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 mediante peleteo de las semillas causó un incremento significativo en el rendimiento (Kg/ha), en comparación con los restantes tratamientos (Figura 23). Además, en comparación con su correspondiente control, el tratamiento de inoculación mediante peleteo incrementó el rendimiento en un 22%.



**Figura 23:** Efecto de la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Peleteo e Inoc. surco) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2015-2016. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.3. Campaña 2016-2017

Este ensayo fue realizado en un campo en la zona de General Cabrera con historial de carbón de maní. En la Figura 24 puede observarse que la inoculación de semillas mediante peleteo con *T. harzianum* ITEM 3636 incrementó significativamente la emergencia de plántulas tras 15 días, desde su siembra. En concreto, la cepa ITEM 3636 estimuló la germinación de semillas de maní en un 36%, en comparación con el tratamiento control.

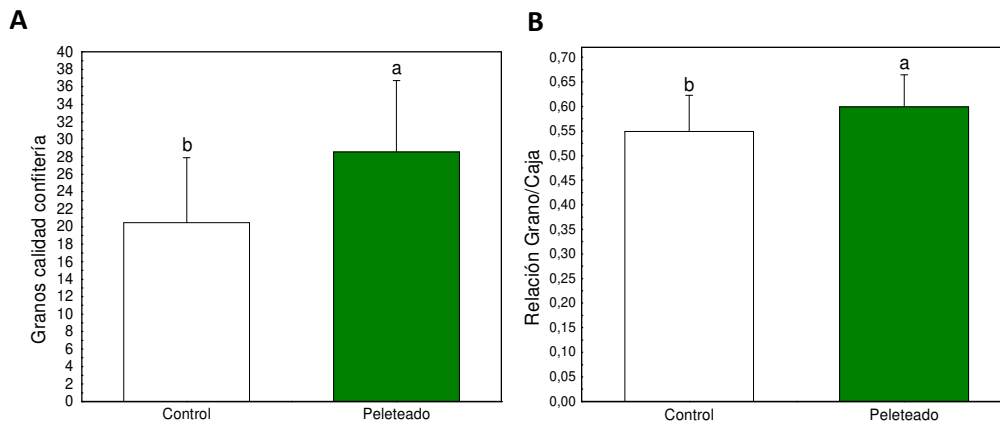


**Figura 24:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre el número de plantas de maní emergidas luego de 15 días post siembra en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.3.1. Efecto sobre el rendimiento a cosecha (120 días post siembra)

##### 4.2.3.3.1.1. Relación grano/caja y número de granos calidad confitería

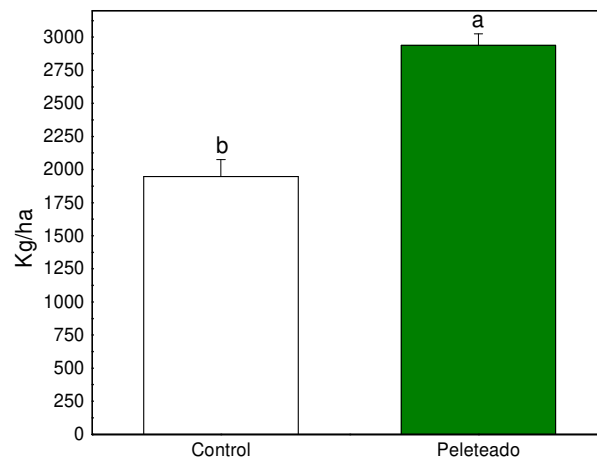
El efecto del tratamiento de semillas de maní con *T. harzianum* ITEM 3636 sobre el número de granos calidad confitería/planta y sobre la relación grano/caja por planta se muestran en la Figura 25. Los resultados evidencian que la inoculación de la cepa ITEM 3636 mediante peleteo de las semillas resultó en incrementos significativos en estos parámetros medidos a cosecha (120 días post siembra). Específicamente, se observó un incremento de ~ 40% en la cantidad de granos calidad confitería/planta (Figura 25A) y de 9% en la relación grano/caja (Figura 25B) por planta en favor del tratamiento de inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636, comparado con las plantas del tratamiento control.



**Figura 25:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre el número promedio de granos de maní calidad confitería por planta (A) y la relación grano/caja por planta de maní (B), ambos datos registrados a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.3.3.1.2. Rendimiento de Kg de granos/ha

Los resultados demuestran que la inoculación con el bioformulado a base de *T. harzianum* ITEM 3636 causó un incremento de ~ 50% en el rendimiento (Kg/ha), en comparación con el tratamiento control (Figura 26). Es decir, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 resultó altamente eficiente para estimular la producción de granos en este cultivo.



**Figura 26:** Efecto del peleteo (*Trichoderma harzianum* ITEM 3636) sobre el rendimiento del cultivo de maní expresado en Kg/ha registrado a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas.

### 4.3. *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 como biocontrolador del carbón del maní

#### 4.3.1. Campaña 2014-2015

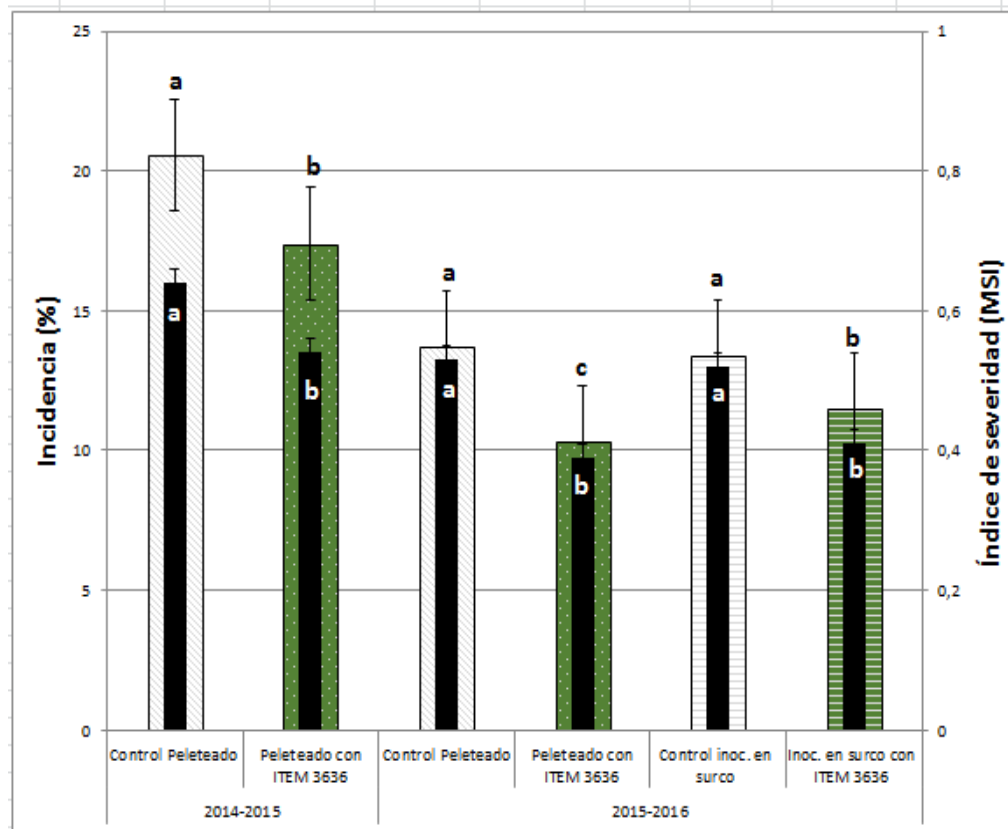
La incidencia (porcentaje de vainas enfermas/planta) del carbón de maní en el cultivar Granoleico, se monitoreó a los 120 días post siembra, en condiciones a campo. La incidencia de la enfermedad resultó moderada, ya que aproximadamente 20% de las vainas de plantas del tratamiento control se vieron afectadas. Sin embargo, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 redujo la incidencia del carbón en un 3% (Fig. 27).

La severidad del carbón de maní también se registró a los 120 días post siembra. En general, la severidad de la enfermedad a campo resultó baja ya que estuvo por debajo de 1, para los dos tratamientos. Sin embargo, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 redujo la severidad del carbón de maní en un 17%, obteniendo un valor de 0,54 para el tratamiento peleteado, comparado con el control en donde la severidad fue de ~ 0.65.

#### 4.3.2. Campaña 2015-2016

En este campo, perteneciente a la zona de General Cabrera, la incidencia de la enfermedad volvió a ser moderada como para el ensayo anterior (<20%). Para esta campaña se incorporó la inoculación de la cepa de *Trichoderma* por riego en el surco de siembra. Los resultados, como se observan en la Figura 27, demuestran que la aplicación de *Trichoderma* redujo sustancialmente la incidencia de la enfermedad. Aunque los mejores resultados fueron obtenidos para la inoculación por peleteo en las semillas, ya que redujo la incidencia en un 3%, aproximadamente, comparado a su control.

Al igual que la incidencia, la severidad de la enfermedad se registró a cosecha (120 días post siembra). Como ocurrió para la campaña anterior, la severidad fue menor a 1. Específicamente, en esta campaña, los resultados mostraron que la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 redujo la severidad promedio de la enfermedad. En este ensayo no hubo un tratamiento de inoculación que haya mostrado mejores resultados comparado con el otro. Sin embargo, la inoculación por peleteo redujo la severidad de la enfermedad en un 25%, mientras que la inoculación en surco lo hizo en un 20%, cada uno comparado con su respectivo control (Figura 27).

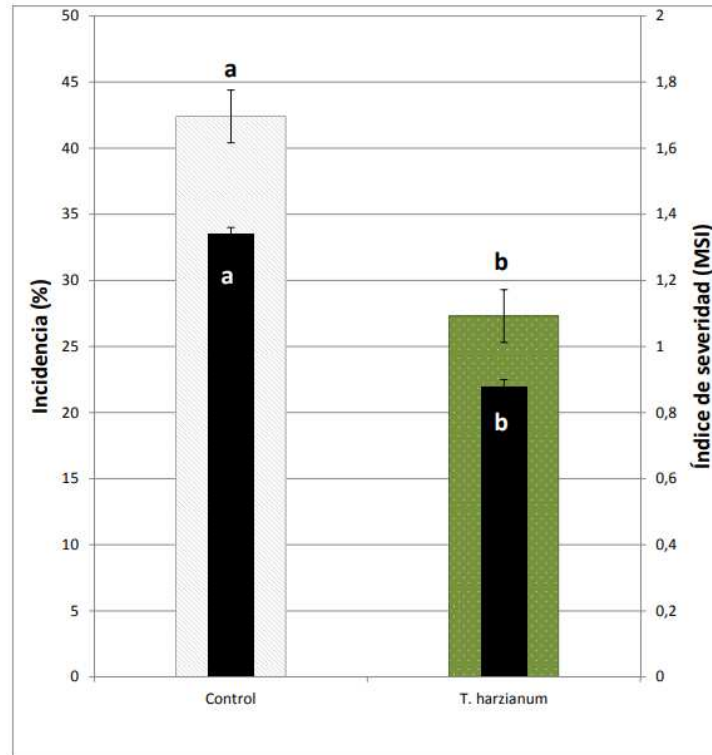


**Figura 27:** Porcentaje de vainas de maní enfermas (Incidencia de la enfermedad) e Índice de Severidad Medio (MSI) registrados a cosecha (120 días post siembra) en los campos de la zona de General Cabrera, campañas 2014-2015 y 2015-2016. El grado de daño de la enfermedad se cuantificó a través de una escala de 0-4, donde, 0: semillas sin síntomas visibles, 1: vaina normal, una semilla con pequeño soro carbonoso, 2: vaina deformada o no, una semilla mitad afectada, 3: vaina malformada y toda una semilla carbonosa, 4: vaina malformada y las dos semillas carbonosas. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas. Las barras de colores corresponden a los valores medios de la incidencia de la enfermedad y las barras negras corresponden a los valores de los MSI.

#### 4.3.3. Campaña 2016-2017

Los resultados mostraron que la incidencia del carbón en el tratamiento control fue alta, alcanzando un valor de 42,4% (Figura 28). Es decir, prácticamente el 50% de las vainas obtenidas de cada planta presentaba síntomas de la enfermedad. Por otro lado, el tratamiento de peleteo de las semillas de maní con la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 causó una disminución significativa en la incidencia del carbón, alcanzando un valor de 27,3 %. De este modo, por medio de la inoculación se logró un control efectivo de la

enfermedad dado que se disminuyó la incidencia en un 15,1%. Adicionalmente, se observó que la severidad del carbón de maní siguió un patrón similar, dado que la inoculación de semillas con *T. harzianum* ITEM 3636 disminuyó la severidad de la enfermedad en un 34%, en comparación con el tratamiento control (Figura 28).



**Figura 28:** Porcentaje de vainas de maní enfermas (Incidencia de la enfermedad) e Índice de Severidad Medio (MSI) registrados a cosecha (120 días post siembra) en el campo de la zona de General Cabrera, campaña 2016-2017. El grado de daño de la enfermedad se cuantificó a través de una escala de 0-4, donde, 0: semillas sin síntomas visibles, 1: vaina normal, una semilla con pequeño soro carbonoso, 2: vaina deformada o no, una semilla mitad afectada, 3: vaina malformada y toda una semilla carbonosa, 4: vaina malformada y las dos semillas carbonosas. Letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas. Las barras de colores corresponden a los valores medios de la incidencia de la enfermedad y las barras negras corresponden a los valores de los MSI.

#### 4.4. Parámetros fisicoquímicos del suelo de los agrícolas

La textura de los suelos de los campos en donde se realizó el ensayo de biocontrol del carbón del maní (Zona General Cabrera) fue franco arenoso (arcilla 8,1%, limo 18,3% y arena 73,6%) para el campo de la campaña 2014-2015, mientras que el suelo de la campaña 2015-2016 fue franco (arcilla 13,9%, limo 37,8% y arena 48,3%). Como se

puede observar en la tabla 4 el porcentaje de materia orgánica aumentó entre la condición pre siembra y el resto de las muestras (75 y 120 días post siembra), además no hubo diferencias en el porcentaje de materia orgánica entre los tratamientos ni entre las respectivas fechas de muestreo (75 y 120 días post siembra) en la campaña 2014-2015. En la campaña 2015-2016 el contenido de materia orgánica se mantuvo homogéneo entre las diferentes muestras, inclusive entre los diferentes tiempos. El pH de los suelos resultó levemente ácido y no se encontró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del ensayo en ambas campañas. Por último, el contenido de nitrógeno aumentó en los diferentes tratamientos con respecto a la condición pre siembra en la campaña 2014-2015, aunque en la campaña posterior el contenido de nitrógeno se mantuvo sin variaciones significativas. Cabe destacar, que la aplicación de la cepa de *Trichoderma* no produjo efecto sobre el contenido de nitrógeno del suelo.

#### **4.5. Análisis molecular para identificar *Thecaphora frezii***

En cuanto al patógeno *Thecaphora frezii*, Conforto *et al.* (2013) realizaron la caracterización molecular de los fragmentos D1 / D2 (región parcial del gen del ARNr 28S) de diferentes aislamientos del mismo obtenidos de distintas regiones de Argentina. Sobre la base de este estudio, se realizó la identificación molecular a través de la secuenciación de las regiones D1/D2 de los aislamientos obtenidos en los ensayos a campo en las campañas 2014-2015 y 2015-2016, denominados ATGC2 y ATGC3, respectivamente. Esto se realizó mediante un análisis utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias de las regiones D1/D2 disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI). Las similitudes de las secuencias fueron de 99% con cepas aisladas de las localidades de General Deheza y Charras para ATGC2 y ATGC3 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank (NCBI) con los números de acceso KX944749 y KX944750, respectivamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

## Resultados

**Tabla 4.** Porcentaje de materia orgánica, pH y contenido de nitrógeno en suelos agrícolas. Las muestras fueron tomadas antes de la siembra, 75 y 120 días después de la siembra durante las campañas del cultivo de maní 2014-2015 y 2015-2016 en campos de la zona de General Cabrera.

Tratamientos	2014-2015	2015-2016	2014-2015	2015-2016	2014-2015	2015-2016
	Materia Orgánica (%)	Materia Orgánica (%)	pH	pH	Contenido de N (%)	Contenido de N (%)
Pre siembra	1,784 ± 0,008 <sup>b</sup>	1,430 ± 0,001 <sup>a</sup>	5,885 ± 0,007 <sup>a</sup>	5,880 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,096 ± 0,015 <sup>b</sup>	0,075 ± 0,001 <sup>a</sup>
CP 75 dps	2,668 ± 0,087 <sup>a</sup>	1,555 ± 0,239 <sup>a</sup>	6,035 ± 0,021 <sup>a</sup>	6,100 ± 0,065 <sup>a</sup>	0,191 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,082 ± 0,002 <sup>a</sup>
P 75 dps	2,792 ± 0,322 <sup>a</sup>	1,282 ± 0,041 <sup>a</sup>	5,865 ± 0,063 <sup>a</sup>	6,030 ± 0,075 <sup>a</sup>	0,169 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,079 ± 0,010 <sup>a</sup>
CP 120 dps	2,812 ± 0,117 <sup>a</sup>	1,316 ± 0,040 <sup>a</sup>	5,870 ± 0,014 <sup>a</sup>	6,155 ± 0,100 <sup>a</sup>	0,172 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,074 ± 0,007 <sup>a</sup>
P 120 dps	3,059 ± 0,524 <sup>a</sup>	1,199 ± 0,083 <sup>a</sup>	5,910 ± 0,070 <sup>a</sup>	6,100 ± 0,105 <sup>a</sup>	0,171 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,080 ± 0,004 <sup>a</sup>
CS 75 dps	TNI	1,555 ± 0,001 <sup>a</sup>	TNI	6,505 ± 0,180 <sup>a</sup>	TNI	0,091 ± 0,001 <sup>a</sup>
S 75 dps	TNI	1,365 ± 0,041 <sup>a</sup>	TNI	6,385 ± 0,045 <sup>a</sup>	TNI	0,087 ± 0,008 <sup>a</sup>
CS 120 dps	TNI	1,396 ± 0,120 <sup>a</sup>	TNI	6,470 ± 0,050 <sup>a</sup>	TNI	0,074 ± 0,002 <sup>a</sup>
S 120 dps	TNI	1,180 ± 0,180 <sup>a</sup>	TNI	6,335 ± 0,001 <sup>a</sup>	TNI	0,092 ± 0,019 <sup>a</sup>

Los tratamientos son: Control peleteado (CP), inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla (P), Control de inoculación en surco (CS) e inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 en el surco de siembra (S). Además, dps: días post siembra.

Cada valor representa el promedio de 2 réplicas ± S.D.

TNI: Tratamiento no incluido.

Las letras diferentes indican, en cada columna, las diferencias estadísticamente significativas entre los valores teniendo en cuenta el método de Holm-Sidak ( $P \leq 0,05$ ).



#### **4.6. Caracterización genotípica y fenotípica de la cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636**

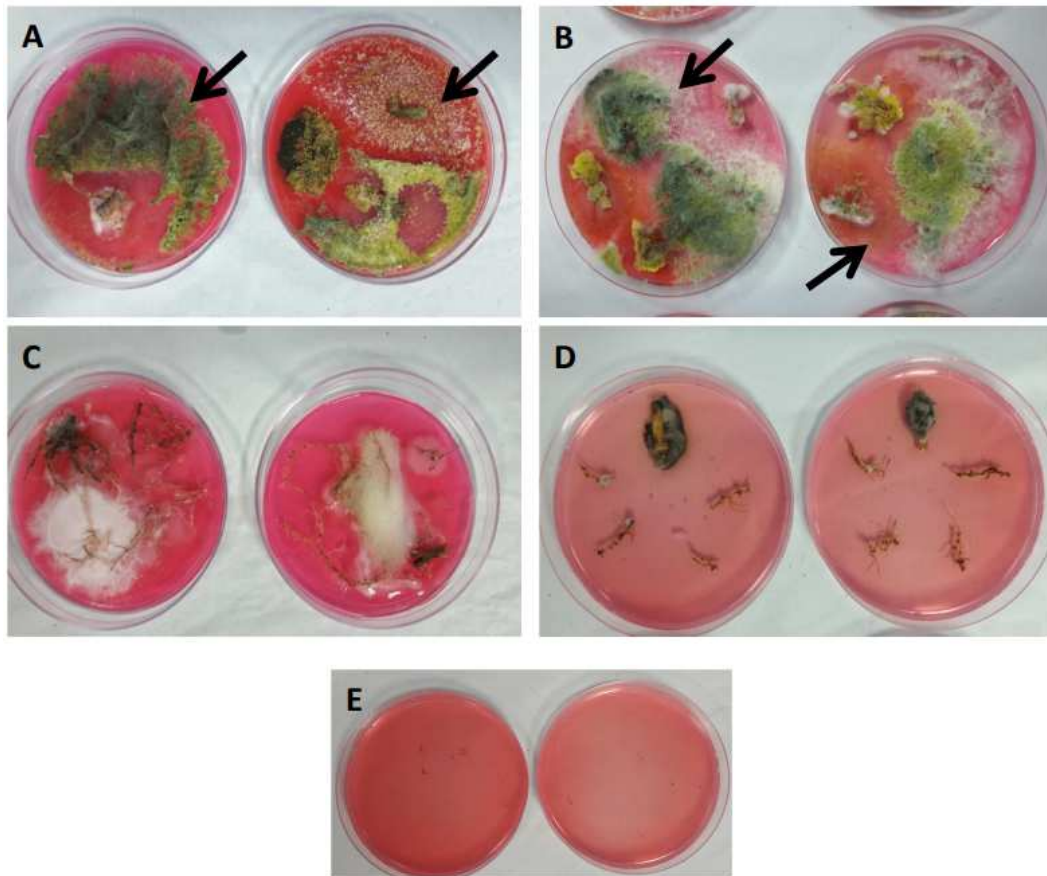
##### **4.6.1. Análisis de similitud de secuencias de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 con secuencias de *Trichoderma harzianum sensu stricto* de una base de datos**

La taxonomía del complejo de especies de *T. harzianum* fue revisada por Chaverri *et al.* (2015). En este trabajo, se determinó que en una gran cantidad de productos de biocontrol comerciales las cepas de los mismos no correspondían a *T. harzianum sensu stricto*, a diferencia de lo que se informa en las etiquetas de estos productos. Además, estos autores proponen el gen del factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  (TEF1) como un marcador confiable para identificar especies dentro de este complejo. Por este motivo se secuenciaron fragmentos de los genes *tef-1 $\alpha$*  y *cal* (calmodulina) de la cepa ITEM 3636. Posteriormente mediante un análisis con la herramienta BLAST (en la base de datos del NCBI) se obtuvieron similitudes de 99% con la cepa de *T. harzianum* IMI 359823 para el gen *tef-1  $\alpha$*  y similitudes de 100% con las cepas de *T. harzianum* GJS04-71, GJS05-107, GJS99-5 para el gen de la calmodulina (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los números de acceso KY595072 y KY595073, respectivamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

##### **4.6.2. *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 como posible colonizador endófito de maní**

Debido a que en algunos casos las especies de *T. harzianum* suelen ser endófitas, en especial de árboles tropicales silvestres (Chaverri *et al.*, 2015), se decidió evaluar la posibilidad de que la cepa ITEM 3636 colonice los tejidos internos de la raíz de la planta de maní. Los resultados muestran, como se puede observar en la Figura 29A y 29B (flechas), el crecimiento de *Trichoderma* en las raíces desinfectadas provenientes de semillas peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636, en los dos tiempos en donde se tomaron las muestras (30 y 120 días post siembra). Si bien no se puede asegurar que la cepa de *Trichoderma* es la misma que se utilizó para la inoculación, al observar las imágenes correspondientes de las placas del tratamiento control (Figura 29C y 29D) no se observa crecimiento de *Trichoderma*, y esto nos podría estar diciendo que tal vez la

cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 tenga un comportamiento como endófito. Aunque, en el futuro, será necesario realizar otros experimentos que permitan confirmar el comportamiento endofítico de la cepa. En el tratamiento de control de esterilidad del suelo (Figura 29E) no se observa crecimiento de *Trichoderma*, por lo tanto, el suelo utilizado en el ensayo de invernadero no se encontraba contaminado con *Trichoderma*.



**Figura 29:** Ensayo de *T. harzianum* ITEM 3636 como posible colonizador endófito de raíces de maní. Raíces desinfectadas de plantas tomadas a (A) 30 días, (B) 120 días post siembra procedentes de semillas de maní inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636; (C) 30 días, (D) 120 días post siembra procedentes de semillas controles. (E) corresponde al control de esterilidad del suelo. En todos los casos se utilizó el medio GSVM.

## **4.7. Estudio del impacto en la diversidad microbiana del suelo agrícola frente a la aplicación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636**

### **4.7.1. Estudio de la diversidad microbiana por PCR-Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

#### **4.7.1.1. Campaña 2014-2015**

##### **4.7.1.1.1. Análisis de la diversidad bacteriana mediante DGGE**

La metodología de DGGE permite observar la diversidad de los filotipos más predominantes de las muestras y evaluar la diversidad de cada muestra a través del cálculo de los índices de diversidad. Para el estudio de la población de bacterias totales se amplificó el dominio V3 del gen de ARNr 16S (Muyzer *et al.*, 1993). Como se observa en la Tabla 5, los valores promedios de los índices de Shannon ( $H'$ ) no presentan variaciones dentro de cada tiempo de muestreo, es decir, la inoculación de la cepa por peleteo en las semillas no generó variaciones significativas para las comunidades bacterianas, al compararse con el tratamiento control. Si fue posible observar una variación entre las dos fechas de muestreo, ya que a los 120 dps la diversidad bacteriana aumenta, se observan mayores valores promedios de  $H'$  con respecto a los 75 dps. Esto puede atribuirse a numerosas variables, tales como el clima, el cultivo, el manejo agronómico y la fauna.

Por otro lado, para los valores promedios de los índices de Simpson (Tabla 6) se obtuvo el mismo resultado que para los índices de Shannon. Es decir, la inoculación por peleteo de las semillas con la cepa de *Trichoderma* no alteró de manera significativa las comunidades bacterianas del suelo. Del mismo modo, se observaron variaciones estadísticamente significativas entre las dos fechas de muestreo, detectando una mayor diversidad al final del ciclo del cultivo (120 dps).

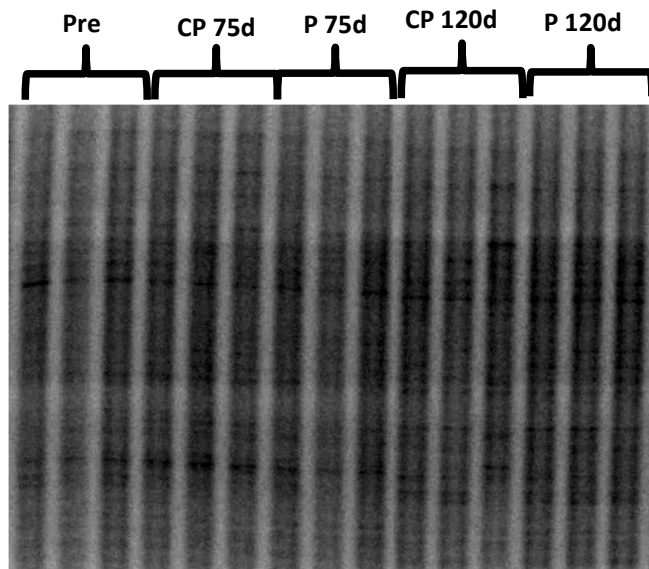
En la Figura 30 se puede observar la fotografía del gel con el perfil de bandas (filotipos) obtenido para las comunidades bacterianas del suelo, para los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo.

#### 4.7.1.1.2. Análisis de la diversidad fúngica mediante DGGE

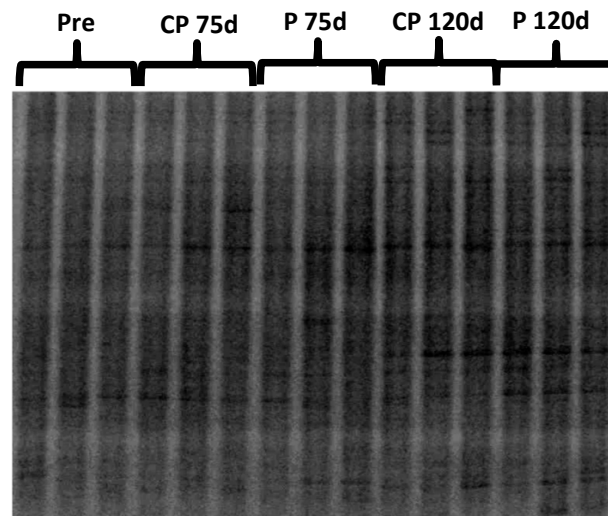
Para el estudio de las poblaciones de hongos se amplificó la región espaciadora interna transcripta (ITS), que es mucho más precisa y posee un mejor potencial para el estudio de comunidades de hongos comparado a genes de ARNr 18S (Liu *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos para los valores de  $H'$  (Tabla 5) muestran que no hubo variaciones entre los diferentes tratamientos; por lo tanto, la inoculación con *Trichoderma* no produjo un impacto significativo en las comunidades fúngicas del suelo en esta campaña. Incluso, no se observaron diferencias significativas en las comunidades fúngicas entre las diferentes fechas de muestreo.

En concordancia con lo expresado anteriormente, se obtuvo el mismo resultado para los índices de Simpson (Tabla 6). De igual manera, la inoculación con la cepa de *Trichoderma* no ocasionó efectos significativos, representado a través de este índice, para las comunidades fúngicas, inclusive entre las diferentes fechas en donde se realizó el experimento.

En la Figura 31 se puede observar la fotografía del gel con el perfil de bandas (filotipos) obtenido para las comunidades fúngicas de suelo, para los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo.



**Figura 30:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2014-2015. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. Dentro de los corchetes se encuentran 3 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1, 2 y 3). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.



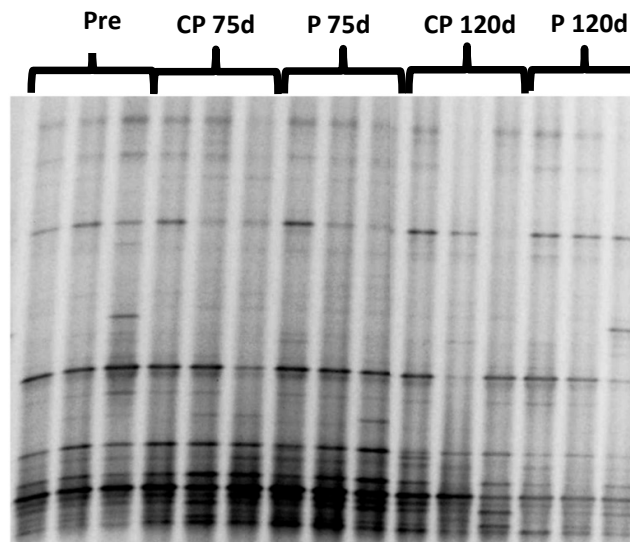
**Figura 31:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de hongos totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2014-2015. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. Dentro de los corchetes se encuentran 3 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1, 2 y 3). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.

#### 4.7.1.1.3. Análisis de la diversidad de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) de la subdivisión $\beta$ del Filo *Proteobacteria* mediante DGGE

Para el estudio de este grupo de microorganismos se utilizaron cebadores específicos para ellos, denominados CTO (Kowalchuk *et al.*, 1997), que amplifican entre las regiones variables bacterianas V2 y V3, y luego se realizó una segunda amplificación con cebadores bacterianos generales que amplifican en la región V3. Para este grupo de bacterias nitrificantes no se encontró variación en los respectivos valores de  $H'$  (Tabla 5) entre ambos tratamientos, por lo cual, la inoculación con la cepa de *Trichoderma* no causó una perturbación significativa en este grupo de bacterias. Al observar el valor promedio de  $H'$  de la condición inicial, se puede notar que este grupo de bacterias no varía demasiado a lo largo del experimento.

De igual manera, los mismos resultados se obtuvieron para los índices de Simpson (Tabla 6), es decir, no se observa una alteración significativa para las comunidades de bacterias nitrificantes ante la aplicación de la cepa de *Trichoderma*. Además, tampoco se encontró una gran variación en los valores promedios de 1-D en este grupo de bacterias a lo largo del ensayo.

En la Figura 32 se puede observar la fotografía del gel con el perfil de bandas (filotipos) obtenido para las comunidades de BOAs del suelo, para los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo.



**Figura 32:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2014-2015. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. Dentro de los corchetes se encuentran 3 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1, 2 y 3). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.

**Tabla 5:** Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos en el ensayo de PCR-DGGE campaña 2014-2015.

Tratamiento	Campo General Cabrera Campaña 2014-2015					
	H' Bacterias		H' BOA		H' Hongos	
	75 dps	120 dps	75 dps	120 dps	75 dps	120 dps
CP	2,65±0,15 <sup>a</sup>	2,84±0,14 <sup>b</sup>	2,57±0,04 <sup>a</sup>	2,56±0,10 <sup>a</sup>	2,75±0,19 <sup>a</sup>	2,76±0,13 <sup>a</sup>
P	2,61±0,12 <sup>a</sup>	2,96±0,06 <sup>b</sup>	2,54±0,01 <sup>a</sup>	2,47±0,09 <sup>a</sup>	2,69±0,13 <sup>a</sup>	2,95±0,08 <sup>a</sup>
Pre Siembra:	2,55±0,16		2,56±0,16		2,96±0,03	

Los valores promedios de  $H'$  con las mismas letras representan que no hubo diferencias estadísticamente significativas aplicando el método de LSD Fisher ( $P < 0.05$ ). El número después de "±" corresponde al desvío estándar. dps: días post siembra. CP: Control peleteado; P: Inoculación por peleteo.

**Tabla 6:** Índices de Simpson (1-D) obtenidos en el ensayo de PCR-DGGE campaña 2014-2015.

Campo General Cabrera Campaña 2014-2015						
Tratamiento	1-D Bacterias		1-D BOA		1-D Hongos	
	75 dps	120 dps	75 dps	120 dps	75 dps	120 dps
CP	0,93±0,01 <sup>a</sup>	0,94±0,01 <sup>b</sup>	0,92±0,01 <sup>a</sup>	0,92±0,01 <sup>a</sup>	0,93±0,01 <sup>a</sup>	0,94±0,01 <sup>a</sup>
P	0,93±0,01 <sup>a</sup>	0,95±0,01 <sup>b</sup>	0,92±0,01 <sup>a</sup>	0,91±0,01 <sup>a</sup>	0,93±0,01 <sup>a</sup>	0,95±0,01 <sup>a</sup>
	Pre Siembra:	0,92±0,01	0,92±0,01		0,95±0,01	

Los valores promedios de los 1-D con las mismas letras representan que no hubo diferencias estadísticamente significativas aplicando el método de LSD Fisher ( $P < 0.05$ ). El número después de "±" corresponde al desvío estándar. dps: días post siembra. CP: Control peleteado; P: Inoculación por peleteo.

#### 4.7.1.2. Campaña 2015-2016

##### 4.7.1.2.1. Análisis de la diversidad bacteriana mediante DGGE

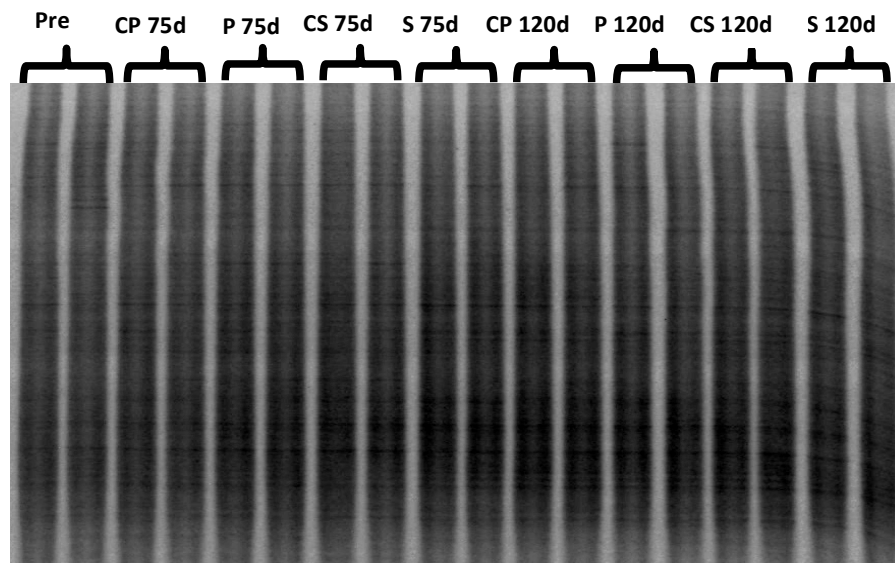
En la tabla 7 se puede observar los índices de Shannon obtenidos en los dos campos, uno en la zona de General Cabrera y el otro en la zona de la localidad de Cuatro Vientos. Como se puede apreciar, en las muestras provenientes de Cabrera se observó una variación entre las comunidades bacterianas más preponderantes obtenidas a los 75 días post siembra con respecto a aquellas obtenidas a los 120 días post siembra. Ahora bien, si consideramos el efecto del biocontrolador, no se observaron variaciones entre los tratamientos inoculados con sus respectivos controles. Es decir, la aplicación de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 no alteró de manera significativa las comunidades bacterianas más predominantes del suelo. También, se puede observar que el tipo de aplicación (Peleteado en la semilla o inoculado en surco de siembra) no generó efectos significativos en las comunidades bacterianas.

Por otro lado, en las muestras provenientes del ensayo a campo en la zona de Cuatro vientos no se observaron variaciones entre las comunidades bacterianas más preponderantes entre los diferentes tiempos de muestreo. Este resultado, quizá pudo ser debido a que en este campo las plantas a los 120 días post siembra aún estaban plantadas, a diferencia de las otras campañas en donde las plantas ya estaban arrancadas secándose en el lote. Además, y en concordancia con los resultados obtenidos hasta el momento, la aplicación de la cepa de *Trichoderma* no alteró de manera significativa a los filotipos bacterianos obtenidos, esto se refleja en que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sus respectivos índices de

Shannon. Del mismo modo que para el campo anterior, la forma de aplicación de la cepa no generó diferencias significativas. Para ambos campos se agrega el valor de los índices de Shannon de la condición pre siembra como un parámetro de referencia.

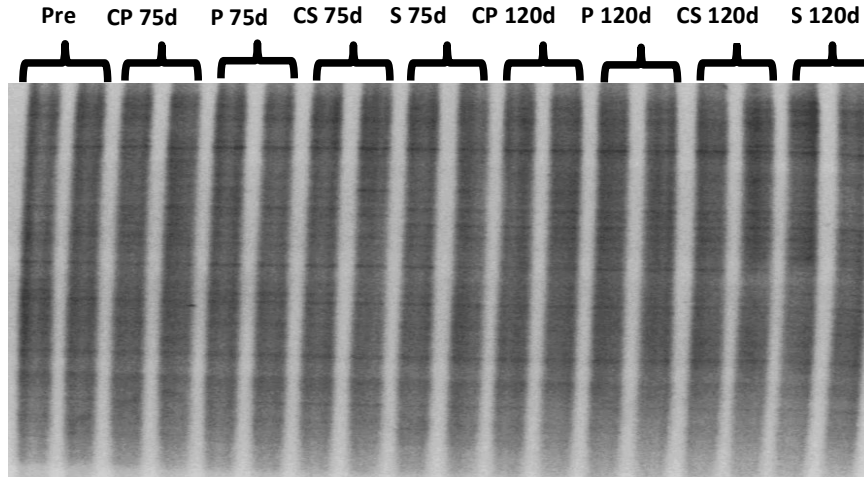
En la tabla 8 se muestran los índices de Simpson (1-D) calculados para las comunidades bacterianas más preponderantes de ambos campos. El resultado de estos índices concuerda exactamente con los resultados de los índices de Shannon en ambos campos. En este caso, también se agregó el respectivo índice obtenido para la condición inicial del lote como un valor de referencia.

Las figuras 33 y 34 corresponden a los perfiles de las comunidades bacterianas del suelo obtenidas para los diferentes ensayos a campo.



**Figura 33:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2015-2016. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. CS: corresponde al tratamiento control surco. S: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 de forma líquida en el surco. Dentro de los corchetes se encuentran 2 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1 y 2). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.





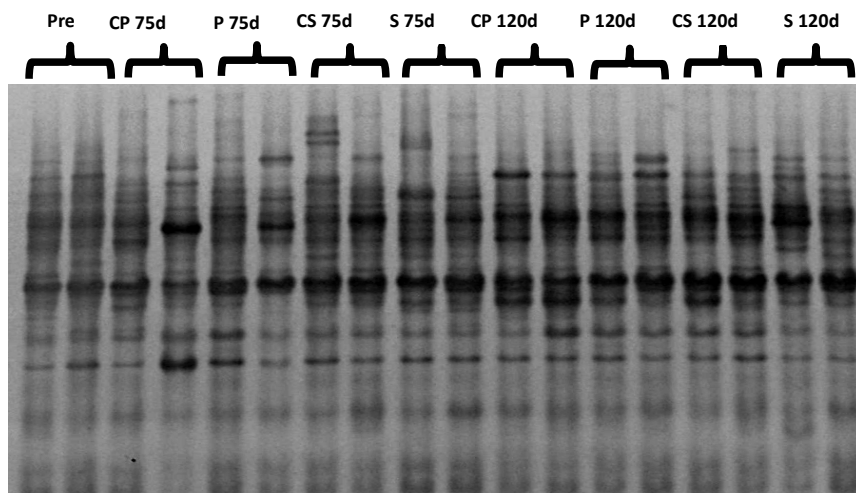
**Figura 34:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de bacterias totales del suelo del campo de la zona de Cuatro Vientos campaña 2015-2016. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. CS: corresponde al tratamiento control surco. S: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 de forma líquida en el surco. Dentro de los corchetes se encuentran 2 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1 y 2). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.

#### 4.7.1.2.2. Análisis de la diversidad fúngica mediante DGGE

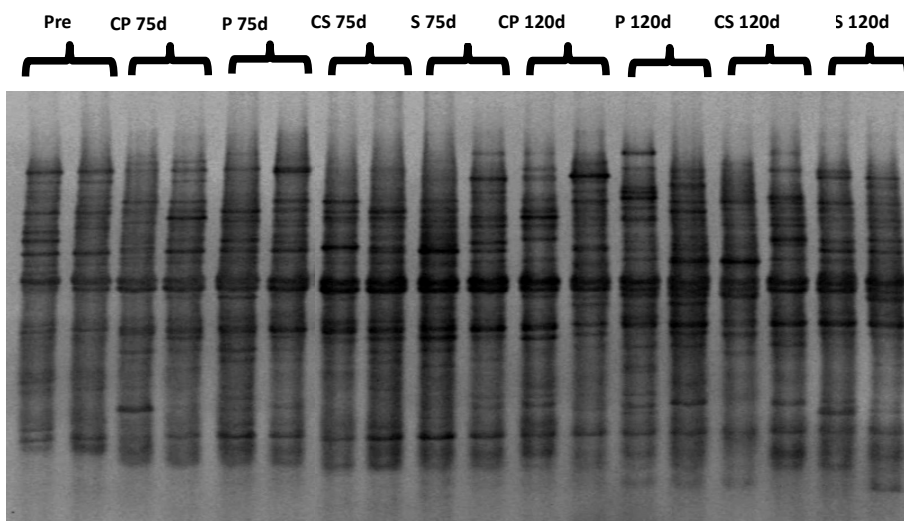
En la tabla 7 se encuentran los valores de los índices de Shannon obtenidos para las comunidades fúngicas de cada una de las muestras de suelo en ambos ensayos a campo. Tal como se puede vislumbrar, los filotipos fúngicos más predominantes de las muestras solo presentaron variaciones significativas entre las diferentes fechas de muestreo (75 y 120 días post siembra) en el campo de la zona de la localidad de Cuatro Vientos. Es importante resaltar que no se obtuvieron variaciones significativas por la aplicación del agente de biocontrol o la forma de aplicación del mismo.

En los índices de Simpson (Tabla 8) se obtuvo el mismo resultado que para los índices de Shannon. Siendo lo más importante que las comunidades fúngicas no varían considerablemente al aplicar la cepa de *Trichoderma* o bien por la forma de aplicación.

Las figuras 35 y 36 corresponden a los diferentes perfiles de las comunidades fúngicas del suelo encontrados en las muestras de los respectivos ensayos a campo.



**Figura 35:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de hongos totales del suelo del campo de la zona de General Cabrera campaña 2015-2016. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. CS: corresponde al tratamiento control surco. S: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 de forma líquida en el surco. Dentro de los corchetes se encuentran 2 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1 y 2). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.



**Figura 36:** Perfil de DGGE correspondiente al estudio de hongos totales del suelo del campo de la zona de Cuatro Vientos campaña 2015-2016. Pre: corresponde a muestras tomadas previo a la siembra. CP: corresponde al tratamiento control peleteado. P: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 peleteado en la semilla. CS: corresponde al tratamiento control surco. S: corresponde al tratamiento inoculado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 de forma líquida en el surco. Dentro de los corchetes se encuentran 2 calles correspondientes a las diferentes réplicas (1 y 2). 75d y 120d: corresponden al número de días post siembra.

## Resultados

**Tabla 7:** Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos en los ensayos de PCR-DGGE campaña 2015-2016.

Campo General Cabrera					Campo Cuatro Vientos				
Tratamientos	$H'$ bacterias		$H'$ Hongos		Tratamientos	$H'$ bacterias		$H'$ Hongos	
	75 dps	120 dps	75 dps	120 dps		75 dps	120 dps	75 dps	120 dps
CP	4,01±0,01 <sup>a</sup>	4,08±0,01 <sup>b</sup>	2,79±0,05 <sup>a</sup>	2,85±0,12 <sup>a</sup>	CP	2,56±0,01 <sup>a</sup>	2,67±0,15 <sup>a</sup>	3,02±0,03 <sup>a</sup>	3,13±0,01 <sup>b</sup>
P	4,03±0,07 <sup>a</sup>	4,11±0,01 <sup>b</sup>	2,79±0,13 <sup>a</sup>	2,63±0,11 <sup>a</sup>	P	2,48±0,12 <sup>a</sup>	2,60±0,05 <sup>a</sup>	3,02±0,11 <sup>a</sup>	3,29±0,10 <sup>b</sup>
CS	4,04±0,02 <sup>a</sup>	4,12±0,01 <sup>b</sup>	2,76±0,09 <sup>a</sup>	2,82±0,08 <sup>a</sup>	CS	2,67±0,05 <sup>a</sup>	2,52±0,06 <sup>a</sup>	3,04±0,01 <sup>a</sup>	3,02±0,04 <sup>b</sup>
S	4,01±0,01 <sup>a</sup>	4,15±0,04 <sup>b</sup>	2,88±0,08 <sup>a</sup>	2,73±0,05 <sup>a</sup>	S	2,64±0,10 <sup>a</sup>	2,44±0,06 <sup>a</sup>	3,11±0,03 <sup>a</sup>	3,13±0,12 <sup>b</sup>
Pre siembra	3,83±0,04		2,70±0,09		Pre siembra	2,71±0,01		2,86±0,12	

Los valores promedios de  $H'$  con las mismas letras representan que no hubo diferencias estadísticamente significativas aplicando el método de LSD Fisher ( $P<0.05$ ). El número después de "±" corresponde al desvío estándar. dps: días post siembra. CP: Control peleteado; P: Inoculación por peleteo; CS: control inoculación surco; S: inoculación en surco de siembra.

**Tabla 8:** Índices de Simpson (1-D) obtenidos en los ensayos de PCR-DGGE campaña 2015-2016.

Campo General Cabrera					Campo Cuatro Vientos				
Tratamientos	1-D bacterias		1-D Hongos		Tratamientos	1-D bacterias		1-D Hongos	
	75 dps	120 dps	75 dps	120 dps		75 dps	120 dps	75 dps	120 dps
CP	0,982±0,001 <sup>a</sup>	0,983±0,001 <sup>b</sup>	0,938±0,004 <sup>a</sup>	0,941±0,007 <sup>a</sup>	CP	0,923±0,001 <sup>a</sup>	0,930±0,010 <sup>a</sup>	0,951±0,002 <sup>a</sup>	0,956±0,001 <sup>b</sup>
P	0,982±0,001 <sup>a</sup>	0,984±0,001 <sup>b</sup>	0,937±0,008 <sup>a</sup>	0,927±0,008 <sup>a</sup>	P	0,916±0,010 <sup>a</sup>	0,926±0,004 <sup>a</sup>	0,951±0,005 <sup>a</sup>	0,963±0,004 <sup>b</sup>
CS	0,982±0,001 <sup>a</sup>	0,984±0,001 <sup>b</sup>	0,936±0,006 <sup>a</sup>	0,939±0,005 <sup>a</sup>	CS	0,931±0,003 <sup>a</sup>	0,920±0,004 <sup>a</sup>	0,952±0,001 <sup>a</sup>	0,951±0,002 <sup>b</sup>
S	0,982±0,001 <sup>a</sup>	0,984±0,001 <sup>b</sup>	0,943±0,004 <sup>a</sup>	0,934±0,004 <sup>a</sup>	S	0,928±0,007 <sup>a</sup>	0,913±0,005 <sup>a</sup>	0,955±0,001 <sup>a</sup>	0,956±0,005 <sup>b</sup>
Pre siembra	0,978±0,001		0,932±0,006		Pre siembra	0,933±0,001		0,942±0,007	

Los valores promedios de 1-D con las mismas letras representan que no hubo diferencias estadísticamente significativas aplicando el método de LSD Fisher ( $P<0.05$ ). El número después de "±" corresponde al desvío estándar. dps: días post siembra. CP: Control peleteado; P: Inoculación por peleteo; CS: control inoculación surco; S: inoculación en surco de siembra.

## **4.7.2. Estudio de secuenciación masiva de amplicones de suelos tratados con el agente de biocontrol**

### **4.7.2.1. Análisis de la diversidad bacteriana**

#### **4.7.2.1.1. Secuencias y OTUs obtenidas**

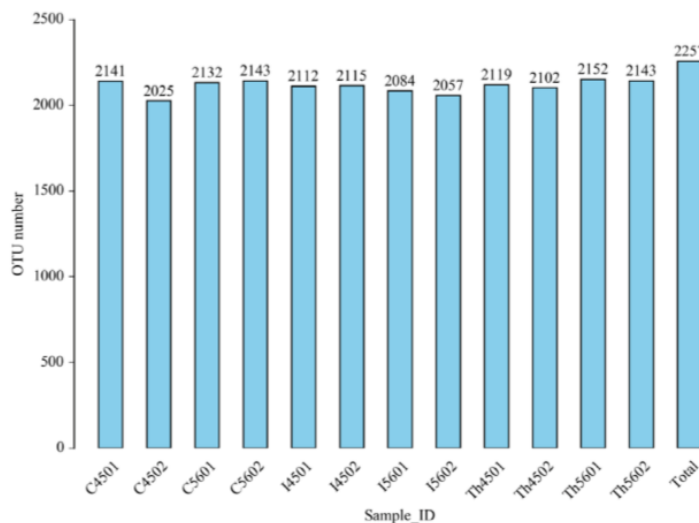
Los estudios de secuenciación NGS brindan una gran cantidad de información, como se puede observar en la tabla 9, se obtuvieron en promedio 80.000 lecturas por muestra con un tamaño promedio de 420 pb aprox. Luego del procedimiento de limpieza de las Lecturas EA (extremos apareados, paired-end en inglés), quedaron alrededor de 69.000 secuencias efectivas por muestra (estas secuencias son aquellas que se utilizan para continuar con el estudio de diversidad, luego de un paso de eliminación de secuencias quiméricas) con un porcentaje de 85% con respecto a las lecturas que salieron directamente del equipo. El porcentaje GC de las secuencias fue muy similar en todas las muestras (57% aprox.) (Tabla 9). Los controles de calidad de las secuencias (Q20 y 30) muestran que aproximadamente el 98% de las secuencias tiene como máximo 1 error cada 100 bases incorporadas y que aproximadamente el 95% de las secuencias tiene como máximo 1 error cada 1000 bases incorporadas. Estos valores, al estar cerca del 100%, están evidenciando que las secuencias obtenidas tienen una muy baja tasa de error.

Para las 12 muestras se obtuvieron entre 2000 a 2100 OTUs aproximadamente (Figura 37), cada uno de ellos son grupos de variantes de secuencias similares, con un 97% de similitud a una secuencia consenso del gen del ARNr 16S. Cada uno de estos grupos está destinado a representar una unidad taxonómica de una especie o género de bacteria dependiendo del umbral de similitud de secuencia. La cantidad de OTUs obtenidos fue muy similar en las muestras tomadas antes de la siembra y las muestras correspondientes a los dos tratamientos. Además no hubo diferencias entre los diferentes campos en los sucesivos años.

**Tabla 9:** Datos de las secuencias obtenidas para el estudio de diversidad bacteriana por secuenciación masiva de amplicones correspondientes a las muestras de suelo de las campañas 2014-2015 y 2015-2016.

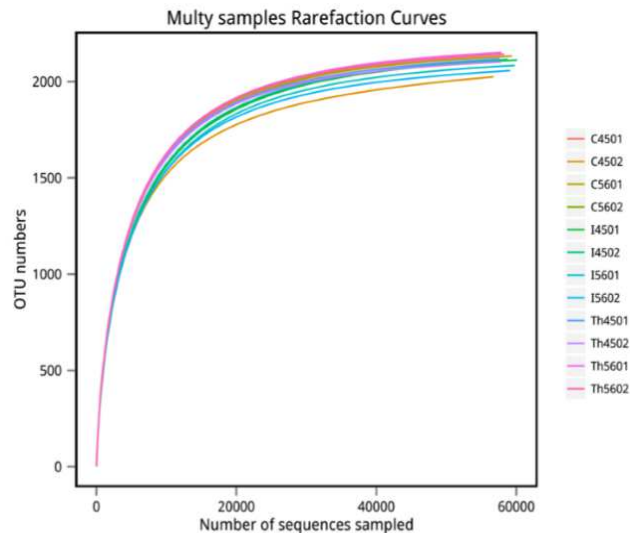
Muestra	Lecturas EA	Etiquetas crudas	Etiquetas limpias	Etiquetas efectivas	Tamaño promedio (pb)	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)	Etiquetas efectivas(%)
C4501	80.002	76.752	69.445	68.887	420	57,47	97,59	95,31	86,11
C4502	80.061	76.930	69.878	68.489	418	57,44	97,69	95,47	85,55
C5601	80.054	77.509	70.770	69.700	419	57,46	97,78	95,64	87,07
C5602	79.969	76.924	69.839	68.863	419	57,59	97,65	95,43	86,11
I4501	79.876	77.071	70.285	69.539	419	57,65	97,71	95,51	87,06
I4502	80.356	77.177	69.599	68.920	419	57,61	97,64	95,38	85,77
I5601	80.185	77.202	70.273	69.400	418	57,62	97,65	95,42	86,55
I5602	79.819	76.743	69.856	68.428	418	57,68	97,66	95,44	85,73
Th4501	79.847	76.601	69.510	68.917	419	57,32	97,63	95,41	86,31
Th4502	80.207	77.210	70.240	69.591	420	57,34	97,68	95,46	86,76
Th5601	79.895	76.855	69.865	68.616	419	57,47	97,67	95,47	85,88
Th5602	80.328	77.601	70.581	69.480	419	57,47	97,72	95,57	86,50

Lecturas EA: Lecturas de extremos apareados (EA). Etiquetas crudas: Corresponden a las etiquetas fusionadas. Etiquetas limpias: las etiquetas después del control de calidad. Etiquetas efectivas: utilizadas para los análisis. Tamaño promedio: la longitud promedio de las etiquetas efectivas. GC (%): porcentaje de G y C. Q20% y Q30%: porcentaje de bases con un índice de calidad igual o superior a 20 (tasa de error <1%) y 30 (tasa de error <0,1%). Etiquetas efectivas (%): Porcentaje de etiquetas efectivas con respecto a las Lecturas EA. Dentro de las muestras, C: tratamiento control, I: condición inicial o pre siembra y Th: inoculación de las semillas con *T. harzianum* ITEM 3636 por peleteo. 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. 01 y 02 corresponden al número de las réplicas.



**Figura 37:** Distribución del número de OTUs bacterianos obtenidos por cada muestra. Dentro de las muestras, C: tratamiento control, I: condición inicial o pre siembra y Th: inoculación de las semillas con *T. harzianum* ITEM 3636 por peleteo. 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. 01 y 02 corresponden al número de las réplicas.

Por otro lado, en las curvas de rarefacción (Figura 38) se observa que alcanzan una meseta hacia la derecha, esto quiere decir que la profundidad de secuenciación de las muestras fue adecuada y que las OTUs obtenidas en el estudio son suficientes para evaluar la variabilidad de la población.



**Figura 38:** Curvas de rarefacción de las OTUs bacterianas obtenidas en el experimento de secuenciación masiva de amplicones para todas las muestras. En donde I: condición inicial; C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. Los números 01 y 02 corresponden a las réplicas.

#### 4.7.2.1.2. Distribución de abundancias relativas bacterianas

En los siguientes histogramas se representan las abundancias relativas a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie bacteriana. Cada color representa un taxón y la longitud de los bloques de color indica la proporción de la abundancia relativa de cada uno. En cada uno de los gráficos se representan los 10 taxones más preponderantes de las muestras con el fin de facilitar la interpretación del histograma.

La Figura 39 corresponde al histograma y la tabla con las distribuciones taxonómicas a nivel de filo. Dentro del grupo Otros (Others) se encuentran los fillos: *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, FCPU426, *Fibrobacteres*, *Ignavibacteriae*, *Parcubacteria*, *Planctomycetes*, *Zixibacteria*, *Saccharibacteria*, *Spirochaetae*, *Tectomicrobia*, WS2 y WS6. Los 10 fillos más representativos estuvieron presentes en todas las muestras y en todas ellas fueron las *Proteobacterias* las más

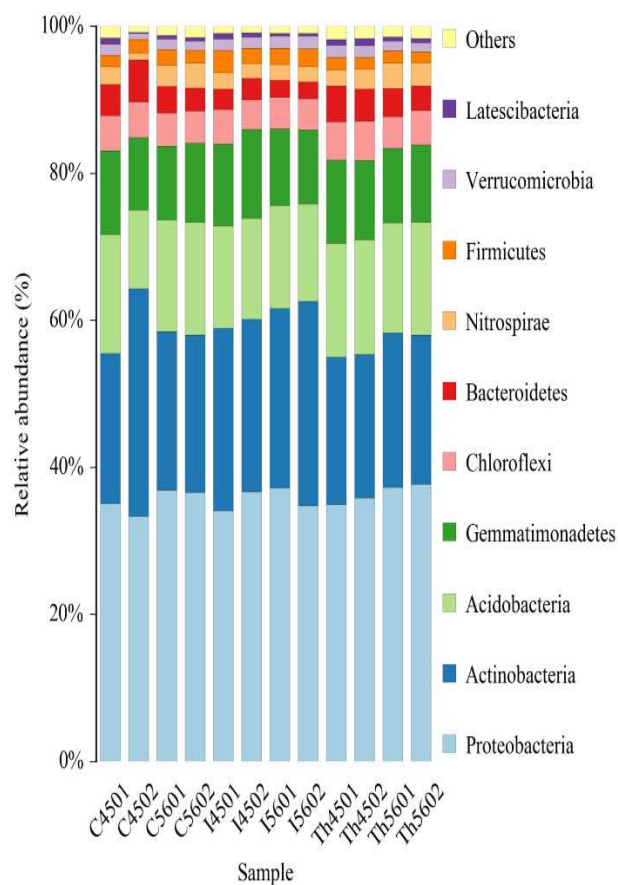
abundantes, con una abundancia relativa que osciló entre un 33 a 37% entre las muestras. Luego, siguiendo un orden descendiente de abundancias relativas se encontraron las *Actinobacterias* que oscilaron entre 19 a 30%. Para este caso la mayor diferencia estuvo entre una réplica del tratamiento control de la campaña 2014-2015 (C4502) y una de las réplicas del tratamiento peleteado con *Trichoderma* para la misma campaña (Th4502). Las *Acidobacterias* oscilaron entre 10 a 16% y la máxima diferencia estuvo entre las réplicas del tratamiento control de la campaña 2014-2015 (C4501 y C4502), aunque hubo diferencias estadísticamente significativas para este filo entre la condición inicial y el tratamiento peleteado en la campaña 2014-2015. El grupo de los *Gemmatimonadetes* no presentó una variación considerable, comparado a los casos anteriores, y osciló entre 9,87 a 12% entre todas las muestras. El filo *Chloroflexi* se mantuvo con una abundancia relativa muy similar entre las muestras (de 4 a 5,34%), no obstante se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y peleteado en la campaña 2014-2015, observándose la mayor abundancia en el tratamiento peleteado. Por otra parte, los *Bacteroidetes* presentaron una variación mayor que el filo mencionado anteriormente, y se trató de 2,33% para la muestra tomada en condición inicial campaña 2015-2016 (I5602) frente a 5,64% de la ya mencionada muestra C4502. Dentro de este filo se encontraron variaciones entre la condición inicial y ambos tratamientos (Control y peleteado) en la campaña 2014-2015, y dentro de la campaña 2015-2016 entre la condición inicial y el tratamiento control. Si bien se trata de muestras tomadas en diferentes lotes y diferentes campañas, se podría remarcar que se está generando un patrón de variación de la muestra C4502 con respecto a las demás. Con respecto al filo *Nitrospirae* se puede observar una variación de la muestra C4502 (1%) con respecto a las demás, aunque la mayor diferencia está con la muestra Th5601 (3,46%), además se observó una mayor abundancia de este filo en el tratamiento peleteado (Th) con respecto a la condición inicial (I) en la campaña 2015-2016. Este cambio fue lo suficientemente importante para producir diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En la muestra I4501 se observó la mayor abundancia relativa (3%) para el filo *Firmicutes*, y este valor fue el doble al observado para la muestra C4501 (1,5%) que fue la muestra con menos representación del filo. El filo *Verrucomicrobia* presentó una variación en un rango de 0,88 a 1,7 para las muestras C4502 e I5602, respectivamente. Dentro del filo *Latescibacteria*, la muestra C4502 tuvo una muy baja abundancia relativa (0,09%) con respecto a las demás muestras; sin embargo las diferencias significativas se encontraron entre la condición inicial y el tratamiento control dentro de la campaña 2015-2016. Para el grupo denominado como Otros la máxima variación se observó entre las muestras C4502 (0,9%) y Th4501 (1,77%); además dentro de este grupo se encontraron las mayores variaciones en las abundancias relativas entre

todas las muestras. En la sección 8.3 correspondiente al anexo de la presente Tesis, se detalla individualmente cada una de las bacterias y hongos, agrupadas dentro de “Otros”, que presentaron variaciones entre las muestras para todas las clasificaciones.

En la figura 40 se pueden observar las diez clases bacterianas más predominantes en las muestras, en las que se encuentran, *Alfaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Betaproteobacteria*, *Thermoleofilia*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Blastocatellia*, *Acidobacteria* y *Sphingobacteriia*. En general, se distribuyeron homogéneamente entre todas las muestras, solo se observó variación (Fig. 40) estadísticamente significativa entre estas clases para *Sphingobacteriia* (pre siembra-tratamiento control), *Thermoleofilia* (pre siembra-tratamiento peleteado), *Deltaproteobacteria* (pre siembra- tratamiento peleteado) y *Gammaproteobacteria* (pre siembra- tratamiento peleteado) en las muestras de la campaña 2014-2015. Por otro lado, en la campaña 2015-2016 se observaron variaciones (Fig. 40) entre las clases *Deltaproteobacteria* (pre siembra- tratamiento control) y *Gammaproteobacteria* (pre siembra- tratamiento peleteado). Cabe destacar que no se observaron variaciones estadísticamente significativas entre el tratamiento control y peleteado para estas clases bacterianas. Además, dentro del histograma se encuentra la leyenda “Otros”, que contiene aquellos microorganismos con un bajo valor de abundancia relativa (menor a 1%), en la cual se encuentran una gran cantidad de clases bacterianas (se detallan en el anexo) y donde se produjeron las mayores variabilidades entre las muestras.

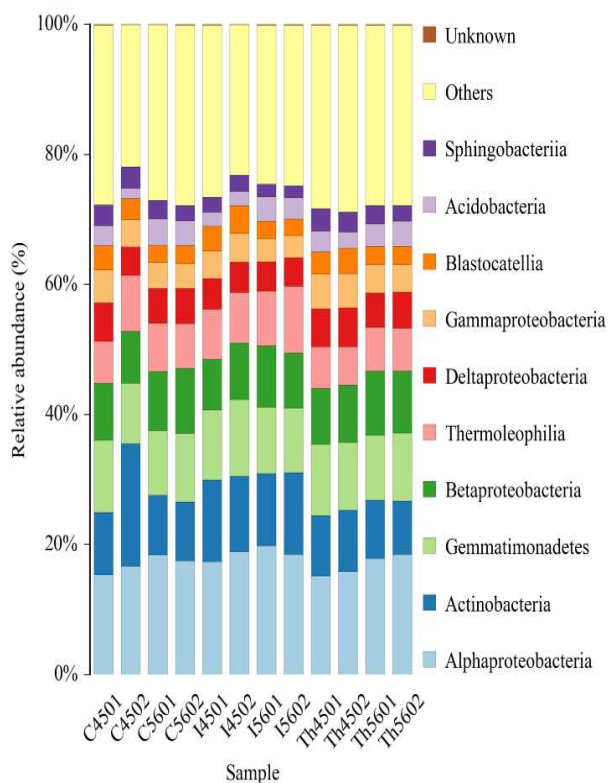
En la figura 41 se puede observar el histograma y la tabla con las abundancias relativas de los diez órdenes bacterianos predominantes en las muestras. Dentro de este grupo se encuentran *Gemmatimonadales*, *Bacterium*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales*, *Xanthomonadales*, *Nitrosomonadales*, *Solirubrobacterales*, *Gaiellales*, *Micromonosporales* y *Blastocatellales*. El término *Bacterium* es utilizado por la base de datos con la cual se compararon las secuencias y está asociado a todos aquellos microorganismos no cultivables (los filotipos dentro de esta clasificación se detallan en el anexo, sección 8.3). En este nivel de clasificación solo se observaron variaciones (Fig. 41) en la abundancia relativa para los órdenes *Gaiellales* y *Rhodospirillales* entre el tratamiento control (C45) y la condición pre siembra (I45), además entre *Nitrosomonadales* y *Xanthomonadales* entre las muestras pre siembra (I45: inicial) y el tratamiento peleteado (Th45) para la campaña 2014-2015. Por otro lado, el orden *Solirubrobacterales* varía entre el tratamiento control (C56) y peleteado (Th56) para la campaña 2015-2016. Aunque, dentro del grupo de microorganismos agrupados dentro de la leyenda “Otros” se observó una variación mayor entre las muestras, como se detalla en el anexo.





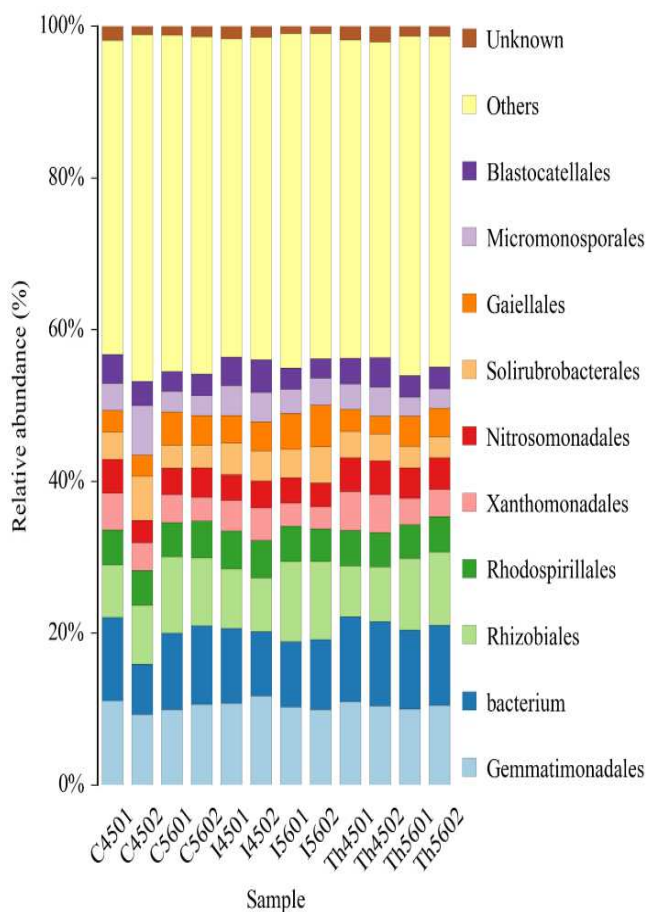
Filo Bacteriano	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
Proteobacterias	34,09	36,67	35,07	33,32	34,96	35,86	37,21	34,78	36,90	36,61	37,26	37,73
Actinobacteria	24,81	23,51	20,39	30,96	20,01	19,51	24,41	27,80	21,58	21,40	21,02	20,26
Acidobacteria	13,95	13,73	16,21	10,71	15,53	15,63	14,02	13,24	15,18	15,36	14,97	15,31
Gemmatimonadetes	11,13	12,09	11,41	9,88	11,32	10,77	10,42	10,06	10,05	10,75	10,13	10,60
Chloroflexi	4,71	4,01	4,79	4,87	5,16	5,35	4,26	4,24	4,52	4,35	4,30	4,66
Bacteroidetes	2,75	2,92	4,20	5,65	4,86	4,33	2,35	2,33	3,61	3,15	3,84	3,31
Nitrospirae	2,27	2,02	2,42	1,02	2,25	2,72	2,13	2,04	2,88	3,37	3,46	3,24
Firmicutes	3,05	2,06	1,51	1,76	1,65	1,61	2,21	2,46	2,09	1,72	1,66	1,43
Verrucomicrobia	1,52	1,53	1,53	0,88	1,65	1,57	1,66	1,72	1,43	1,26	1,33	1,27
Latescibacteria	0,74	0,55	0,84	0,09	0,82	0,99	0,37	0,33	0,51	0,50	0,59	0,55
Otros	0,97	0,92	1,61	0,86	1,78	1,67	0,96	0,99	1,25	1,52	1,44	1,65

**Figura 39:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Filo bacteriano presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



Clase Bacteriana	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Alfaproteobacteria</i>	17,35	18,89	15,36	16,69	15,15	15,86	19,77	18,50	18,41	17,48	17,80	18,45
<i>Actinobacteria</i>	12,57	11,64	9,58	18,78	9,33	9,40	11,10	12,52	9,15	9,04	9,01	8,23
<i>Gemmatimonadetes</i>	10,80	11,77	11,10	9,33	10,95	10,43	10,27	9,95	9,95	10,60	9,96	10,48
<i>Betaproteobacteria</i>	7,77	8,68	8,75	8,01	8,64	8,82	9,41	8,49	9,13	9,95	9,83	9,53
<i>Thermoleophilia</i>	7,73	7,78	6,46	8,58	6,39	5,96	8,42	10,25	7,43	6,93	6,78	6,59
<i>Deltaproteobacteria</i>	4,70	4,66	5,90	4,40	5,77	5,96	4,50	4,39	5,34	5,37	5,27	5,58
<i>Gammaproteobacteria</i>	4,28	4,45	5,07	4,23	5,40	5,23	3,54	3,40	4,03	3,82	4,33	4,18
<i>Blastocatellia</i>	3,77	4,26	3,78	3,18	3,39	3,92	2,73	2,57	2,64	2,82	2,80	2,83
<i>Acidobacteria</i>	2,15	2,19	3,07	1,63	3,16	2,48	3,71	3,28	4,03	3,82	3,46	3,87
<i>Sphingobacteriia</i>	2,28	2,50	3,15	3,24	3,48	3,05	1,97	1,83	2,84	2,37	2,84	2,44
Otros	26,44	23,07	27,62	21,83	28,16	28,72	24,43	24,68	26,97	27,68	27,80	27,69
Desconocidos	0,14	0,10	0,14	0,07	0,15	0,15	0,13	0,14	0,10	0,11	0,11	0,12

**Figura 40:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Clase bacteriana presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



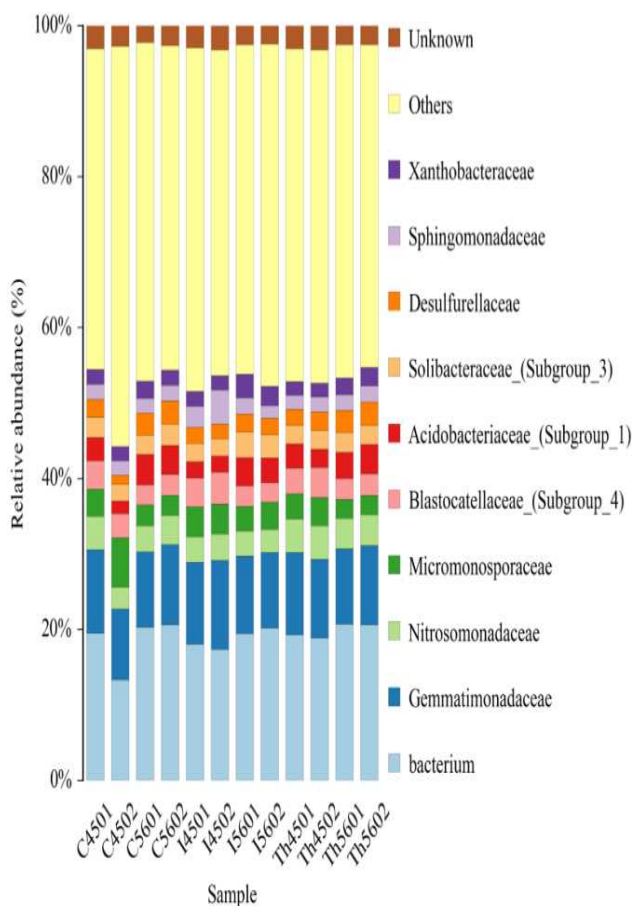
Orden Bacteriana	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Gemmatimonadales</i>	10,80	11,78	11,10	9,34	10,95	10,44	10,27	9,96	9,95	10,60	9,96	10,49
<i>Bacterium</i>	9,84	8,38	10,94	6,58	11,21	11,07	8,58	9,21	10,03	10,36	10,47	10,55
<i>Rhizobiales</i>	7,82	7,11	6,97	7,78	6,75	7,26	10,59	10,25	10,10	9,01	9,48	9,64
<i>Rhodospirillales</i>	5,05	4,96	4,59	4,60	4,66	4,49	4,63	4,36	4,52	4,81	4,42	4,66
<i>Xanthomonadales</i>	4,02	4,33	4,86	3,67	5,13	4,99	3,10	2,92	3,64	3,12	3,48	3,63
<i>Nitrosomonadales</i>	3,42	3,53	4,46	2,94	4,43	4,46	3,34	3,10	3,49	3,90	4,04	4,16
<i>Solirubrobacterales</i>	4,17	3,95	3,59	5,82	3,52	3,58	3,75	4,77	3,08	3,00	2,80	2,84
<i>Gaiellales</i>	3,57	3,83	2,87	2,76	2,88	2,38	4,67	5,48	4,35	3,93	3,98	3,76
<i>Micromonosporales</i>	4,00	3,91	3,56	6,57	3,35	3,76	3,24	3,59	2,75	2,62	2,50	2,54
<i>Blastocatellales</i>	3,77	4,26	3,78	3,19	3,39	3,93	2,73	2,57	2,64	2,82	2,80	2,84
Otros	41,87	42,45	41,38	45,65	41,91	41,56	44,10	42,78	44,29	44,45	44,77	43,59
Desconocidos	1,65	1,48	1,87	1,08	1,80	2,06	0,98	0,99	1,16	1,37	1,31	1,31

**Figura 41:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Orden bacteriano presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

En la figura 42 se observa el histograma y la tabla con las diez familias bacterianas con mayores abundancias relativas, y son: *Bacterium*, *Gemmatimonadaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Micromonosporaceae*, *Blastocatellaceae*\_(Subgroup\_4), *Acidobacteriaceae*\_(Subgroup\_1), *Solibacteraceae*\_(Subgroup\_3), *Desulfurellaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Xanthobacteraceae*. Dentro de estas familias con mayores abundancias relativas se encontró una variación (Fig. 42) significativa en las bacterias pertenecientes a *Nitrosomonadaceae* entre las muestras pre siembra (I45) y las muestras del tratamiento peleteado con *Trichoderma* (Th45). Por otro lado, en la campaña 2015-2016 la familia de las *Desulfurellaceae* varió (Fig. 42) entre las muestras pre siembra (I56) y el tratamiento control (C56). Además hubo una variación (Fig. 42) estadísticamente significativa en la familia *Nitrosomonadaceae* entre la condición pre siembra (I56) y el tratamiento peleteado (Th56). Sin embargo, dentro del grupo de microorganismos agrupados dentro de la leyenda “Otros” se dio una variación mayor entre las muestras, como se detalla en el anexo.

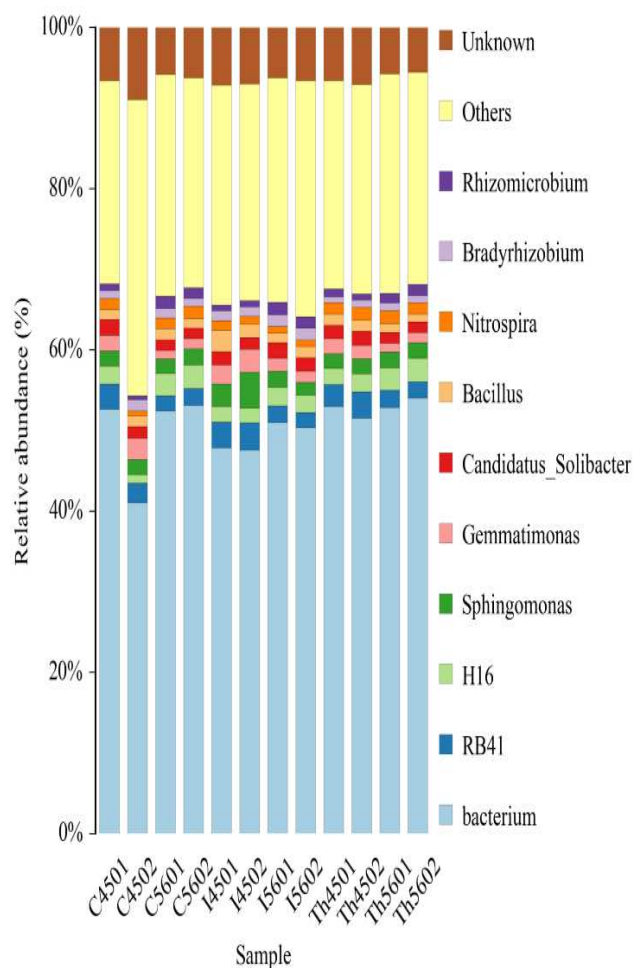
A nivel de género, como se puede observar en la figura 43, se representan los géneros bacterianos con mayores abundancias relativas presentes en las muestras. Ellos son *Bacterium*, RB41, H16, *Sphingomonas*, *Gemmatimonas*, *Candidatus\_Solibacter*, *Bacillus*, *Nitrospira*, *Bradryrhizobium* y *Rhizomicrobium*. Para la campaña 2014-2015 se observó variación (Fig. 43) dentro las bacterias agrupadas como *Bacterium* entre la condición pre siembra (I45) y el tratamiento peleteado (Th45). Además, en la campaña 2015-2016 los géneros de bacterias H16 y *Nitrospira* presentaron diferencias en sus abundancias relativas (Fig. 43) entre la condición pre siembra (I56) y el tratamiento control (C56). También, dentro de esta misma campaña, los géneros *Bradryrhizobium* y *Nitrospira* variaron entre la condición pre siembra (I56) y el tratamiento peleteado (Th56). Dentro del grupo de microorganismos agrupados dentro de la leyenda “Otros” se dio una variación mayor entre las muestras, como se detalla en el anexo.

En el histograma y la tabla con las abundancias relativas, correspondiente a la Figura 44, se observan las 10 especies bacterianas más predominantes de las muestras de suelos en las dos campañas agrícolas. Entre ellas encontramos: *Bacterium*, *Acidobacteria\_bacterium*, *Gemmatimonadetes\_bacterium*, *proteobacterium*, *Alpha\_proteobacterium*, *Forest\_soil\_bacterium*, *Chloroflexi\_bacterium*, *Punica\_granatatum*\_(pomegranate), *Beta\_proteobacterium* y *Soil\_bacterium*. En la primer campaña 2014-2015 hubo variaciones en las especies *Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium* (Dentro de “Otros”), *Soil\_bacterium* y *Alpha\_proteobacterium* entre la condición pre siembra (I45) y el tratamiento control (C45). Además las especies *Alpha\_proteobacterium*, *Bacteroidetes\_bacterium* (Dentro de



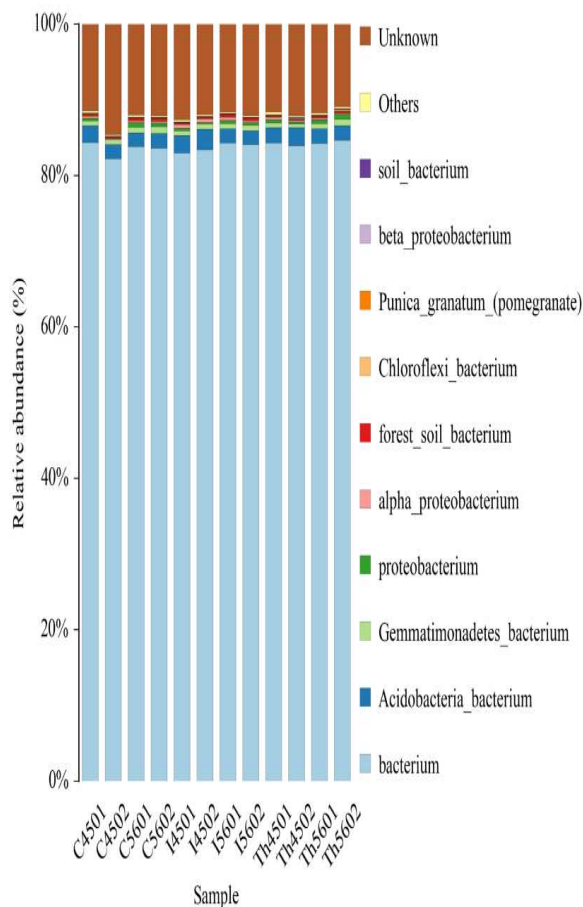
Familia Bacteriana	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Bacterium</i>	18,08	17,35	19,45	13,35	19,29	18,86	19,46	20,24	20,30	20,65	20,69	20,63
<i>Gemmatimonadaceae</i>	10,82	11,79	11,11	9,34	10,96	10,45	10,28	9,97	9,95	10,61	9,92	10,50
<i>Nitrosomonadaceae</i>	3,42	3,53	4,46	2,94	4,43	4,46	3,35	3,11	3,50	3,90	4,03	4,16
<i>Micromonosporaceae</i>	4,00	3,92	3,57	6,57	3,36	3,77	3,25	3,60	2,75	2,62	2,49	2,55
<i>Blastocatellaceae_(Subgroup_4)</i>	3,78	4,27	3,79	3,19	3,40	3,93	2,73	2,57	2,64	2,83	2,79	2,84
<i>Acidobacteriaceae_(Subgroup_1)</i>	2,16	2,19	3,07	1,63	3,17	2,49	3,72	3,28	4,03	3,83	3,45	3,87
<i>Solibacteraceae_(Subgroup_3)</i>	2,49	2,29	2,73	2,29	2,50	2,46	3,43	3,10	2,61	2,84	2,60	2,58
<i>Desulfurellaceae</i>	2,13	1,93	2,33	1,16	2,12	2,45	2,37	2,20	2,95	3,05	2,89	3,09
<i>Sphingomonadaceae</i>	2,82	4,52	2,01	1,94	1,87	2,02	2,17	1,64	1,93	2,08	2,10	2,16
<i>Xanthobacteraceae</i>	1,95	1,85	1,96	1,84	1,84	1,77	3,12	2,58	2,27	2,06	2,23	2,40
Otros	45,46	43,18	42,41	53,01	44,03	44,10	43,66	45,31	44,82	42,93	44,30	42,77
Desconocidos	2,88	3,16	3,10	2,71	3,03	3,22	2,46	2,40	2,25	2,60	2,51	2,46

**Figura 42:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Familias bacterianas presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



Género Bacteriano	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Bacterium</i>	47,96	47,65	52,73	41,07	53,08	51,60	51,07	50,42	52,44	53,20	52,52	54,10
<i>RB41</i>	3,16	3,44	3,17	2,49	2,74	3,26	2,05	1,94	1,92	2,14	2,10	2,04
<i>H16</i>	1,97	1,79	2,19	1,04	2,02	2,28	2,30	2,10	2,79	2,94	2,73	2,93
<i>Sphingomonas</i>	2,79	4,48	1,93	1,85	1,78	1,89	2,07	1,61	1,78	2,02	1,97	1,98
<i>Gemmatimonas</i>	2,36	2,84	1,94	2,63	1,89	1,61	1,60	1,45	1,08	1,19	1,04	1,26
<i>Candidatus_Solibacter</i>	1,71	1,49	1,95	1,48	1,70	1,75	1,90	1,67	1,31	1,34	1,37	1,30
<i>Bacillus</i>	2,65	1,67	1,27	1,34	1,40	1,40	1,20	1,40	1,39	1,21	1,10	0,97
<i>Nitrospira</i>	1,19	0,96	1,36	0,64	1,38	1,58	0,83	0,82	1,31	1,55	1,54	1,43
<i>Bradyrhizobium</i>	1,24	1,14	0,98	1,39	0,80	0,91	1,52	1,45	1,17	0,95	0,93	0,90
<i>Rhizomicrobium</i>	0,68	0,81	0,86	0,50	0,97	0,76	1,47	1,43	1,55	1,35	1,19	1,34
Otros	27,14	26,72	25,07	36,61	25,65	25,91	27,73	29,19	27,46	25,91	27,72	26,26
Desconocidos	7,14	7,00	6,54	8,93	6,58	7,02	6,26	6,54	5,79	6,20	5,79	5,49

**Figura 43:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Género bacteriano presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



Especie Bacteriana	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
Bacterium	83,11	83,50	84,46	82,30	84,40	84,05	84,41	84,19	83,90	83,71	83,77	84,81
Acidobacteria_bacterium	2,27	2,68	2,25	1,91	1,99	2,38	1,87	1,80	1,83	1,96	1,91	1,95
Gemmatimonadetes_bacterium	0,65	0,70	0,67	0,62	0,67	0,49	0,74	0,75	0,70	0,85	0,64	0,83
Proteobacterium	0,32	0,22	0,32	0,03	0,44	0,28	0,40	0,41	0,67	0,50	0,48	0,68
Alpha_proteobacterium	0,50	0,53	0,31	0,12	0,30	0,25	0,39	0,20	0,22	0,22	0,23	0,18
Forest_soil_bacterium	0,18	0,17	0,20	0,13	0,18	0,11	0,38	0,34	0,32	0,34	0,26	0,27
Chloroflexi_bacterium	0,03	0,06	0,05	0,08	0,08	0,06	0,06	0,03	0,04	0,06	0,06	0,16
Punica_granatum_(pomegranate)	0,06	0,04	0,05	0,07	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,08	0,02	0,00
Beta_proteobacterium	0,04	0,03	0,04	0,00	0,05	0,08	0,00	0,04	0,02	0,01	0,01	0,04
Soil_bacterium	0,04	0,04	0,02	0,03	0,01	0,07	0,02	0,01	0,02	0,03	0,05	0,03
Otras	0,23	0,17	0,24	0,18	0,28	0,17	0,19	0,21	0,27	0,24	0,34	0,27
Desconocido	12,55	11,85	11,38	14,49	11,52	12,02	11,52	12,02	11,98	11,99	12,23	10,80

**Figura 44:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Especies bacterianas presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

“Otros”) y *Burkholderiales\_bacterium* (Dentro de “Otros”) variaron entre la condición pre siembra (I45) y el tratamiento peleteado (Th45). Por otro lado, para la campaña 2015-2016, se presentaron diferencias para *Soil\_bacterium* entre la condición pre siembra (I56) y el tratamiento control (C56); así también se observó variación en la especie *Forest\_soil\_bacterium* entre los tratamientos control (C56) y peleteado (Th56). Además, las especies *Soil\_bacterium* y *Verrucomicrobia\_bacterium* (Dentro de “Otros”) variaron entre la condición pre siembra (I56) y el tratamiento peleteado (Th56).

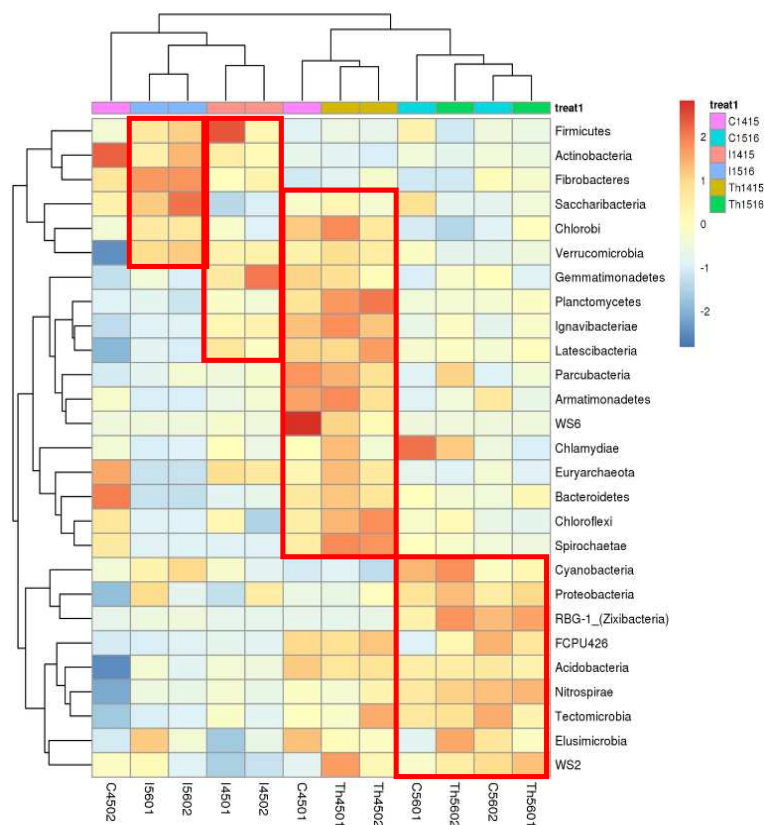
### **4.7.2.1.3. Mapas de calor de abundancias bacterianas para los diferentes niveles taxonómicos**

El mapa de calor es una representación gráfica en la cual se describen las abundancias de los diferentes taxones de acuerdo a un gradiente de color y se genera una matriz de similitudes entre las muestras y las diferentes especies de microorganismos. El análisis de agrupamiento de mapas de calor se realizó a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie. En los resultados de agrupamientos de mapa de calor, el color representa la abundancia de las diferentes especies. Además el agrupamiento vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes especies, es decir, mientras más corta es la longitud de la rama entre las dos especies mayor es la similitud de la abundancia de esos microorganismos. También, el agrupamiento horizontal indica la similitud del tipo de microorganismo y las abundancias de los mismos en las diferentes muestras, mientras más corta sea la longitud de rama entre las muestras, mayor será la similitud entre las mismas.

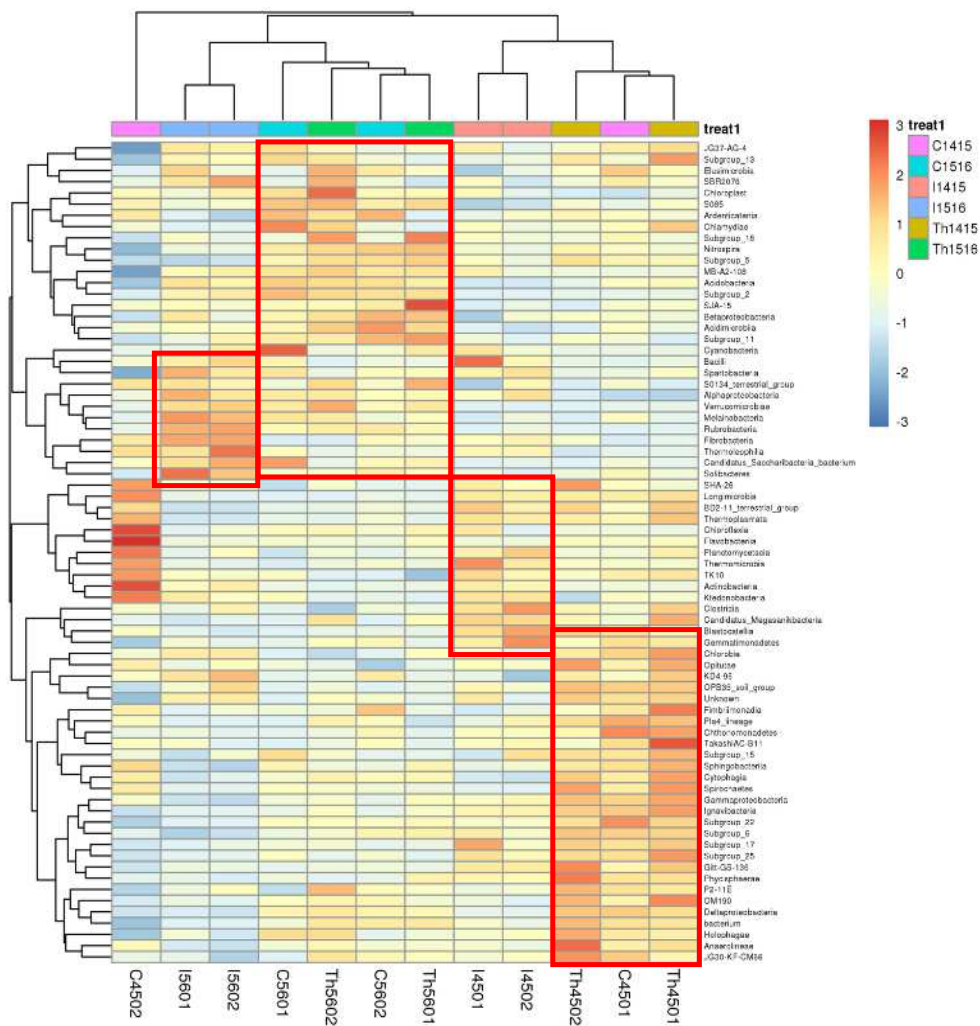
La figura 45 corresponde al mapa de calor asociado a filo bacteriano y en ella se puede observar una primer separación de las muestras entre las condiciones iniciales, por un lado, y las muestras tomadas a 120 días post siembra por el otro. Las muestras pre siembra se separan de acuerdo a la campaña, esto es, 2014-2015 y 2015-2016. Por otro lado se encuentran las muestras tomadas a los 120 días post siembra, que de igual manera se separan de acuerdo al año de la campaña. Dentro de estos grupos no se observa una marcada diferencia entre las muestras del tratamiento control y peleteado. En este tipo de gráficos es interesante observar similitudes de grupos de microorganismos (marcados con cuadros rojos) entre las muestras, como se observan en la figura 45. Una de las muestras correspondientes al tratamiento control de la campaña 2014-2015 no presenta similitud con ninguna de las otras muestras.



En la figura 46 se describe el mapa de calor correspondiente a la clasificación de clase bacteriana. A diferencia de la figura anterior en este caso las muestras sufren una primer separación de acuerdo al año de la campaña (2014-2015 y 2015-2016). Luego, dentro de cada uno de los grupos asociados a las campañas, las muestras se vuelven a separar por el periodo de muestreo (pre siembra y 120 días post siembra) y no se observa una diferencia entre los diferentes tratamientos (Control y peleteado). Al igual que para el gráfico anterior, se pueden observar grupos de clases bacterianas que presentan abundancias similares entre las diferentes muestras (marcadas con cuadros rojos).

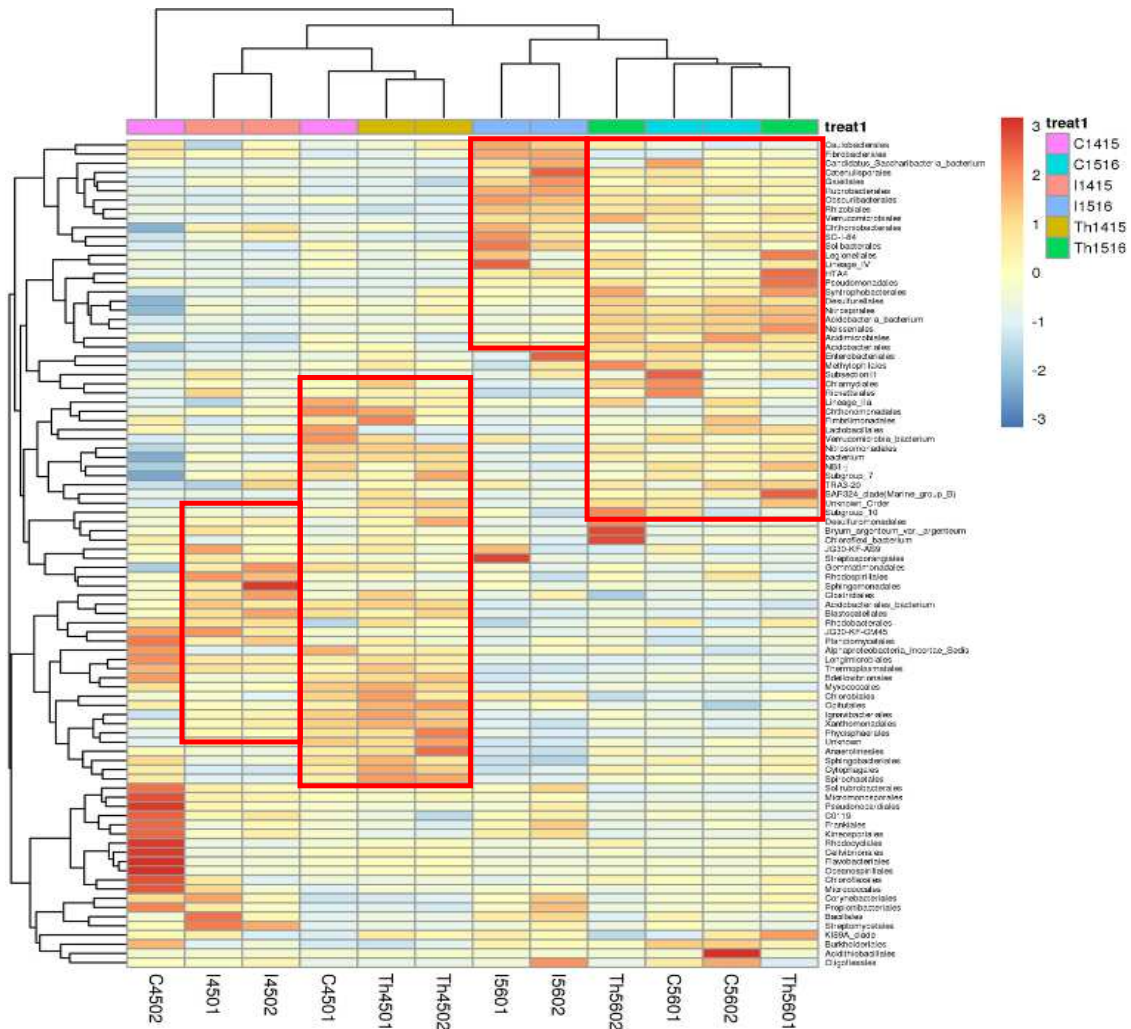


**Figura 45:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a filo bacteriana. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes filios y la agrupación horizontal indica la similitud de los diferentes filios y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



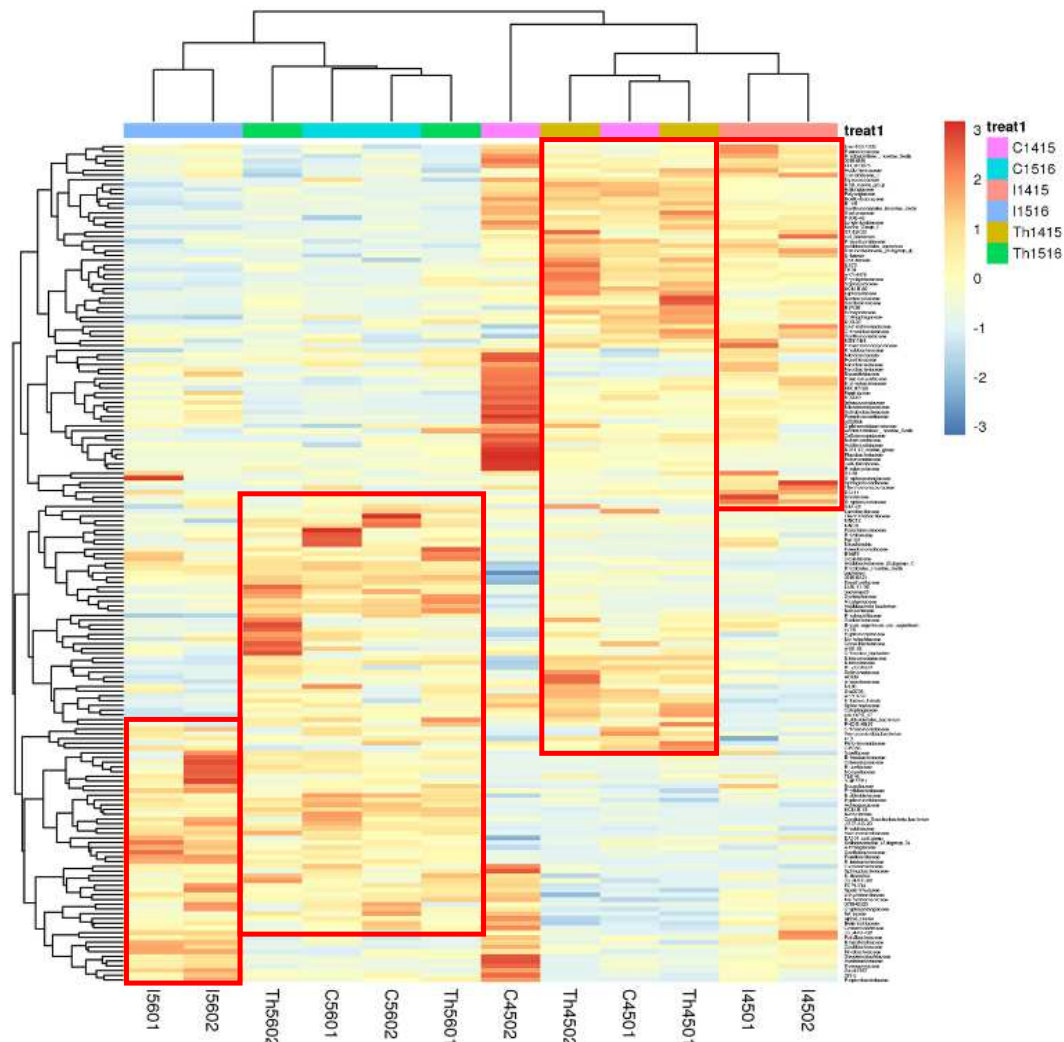
**Figura 46:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a clase bacteriana. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes clases y la agrupación horizontal indica la similitud de las diferentes clases y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

A nivel de orden bacteriano se puede observar en la figura 47 una distribución similar a la reportada anteriormente, para clase bacteriana. Las muestras se separan de acuerdo al año de la campaña y posteriormente se separan de acuerdo a la fecha del muestreo y no se observa una diferencia considerable entre los tratamientos. En los recuadros en rojo se marcan aquellos órdenes bacterianos con abundancias similares entre las muestras.



**Figura 47:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a orden bacteriano. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes órdenes y la agrupación horizontal indica la similitud de los diferentes órdenes y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

Resultados similares, a los expresados anteriormente, se obtuvieron en el mapa de calor correspondiente a familia bacteriana (Figura 48). Con cuadros rojos se marcan aquellas muestras que presentaron similitudes, tanto para el tipo de microorganismo como para su abundancia.

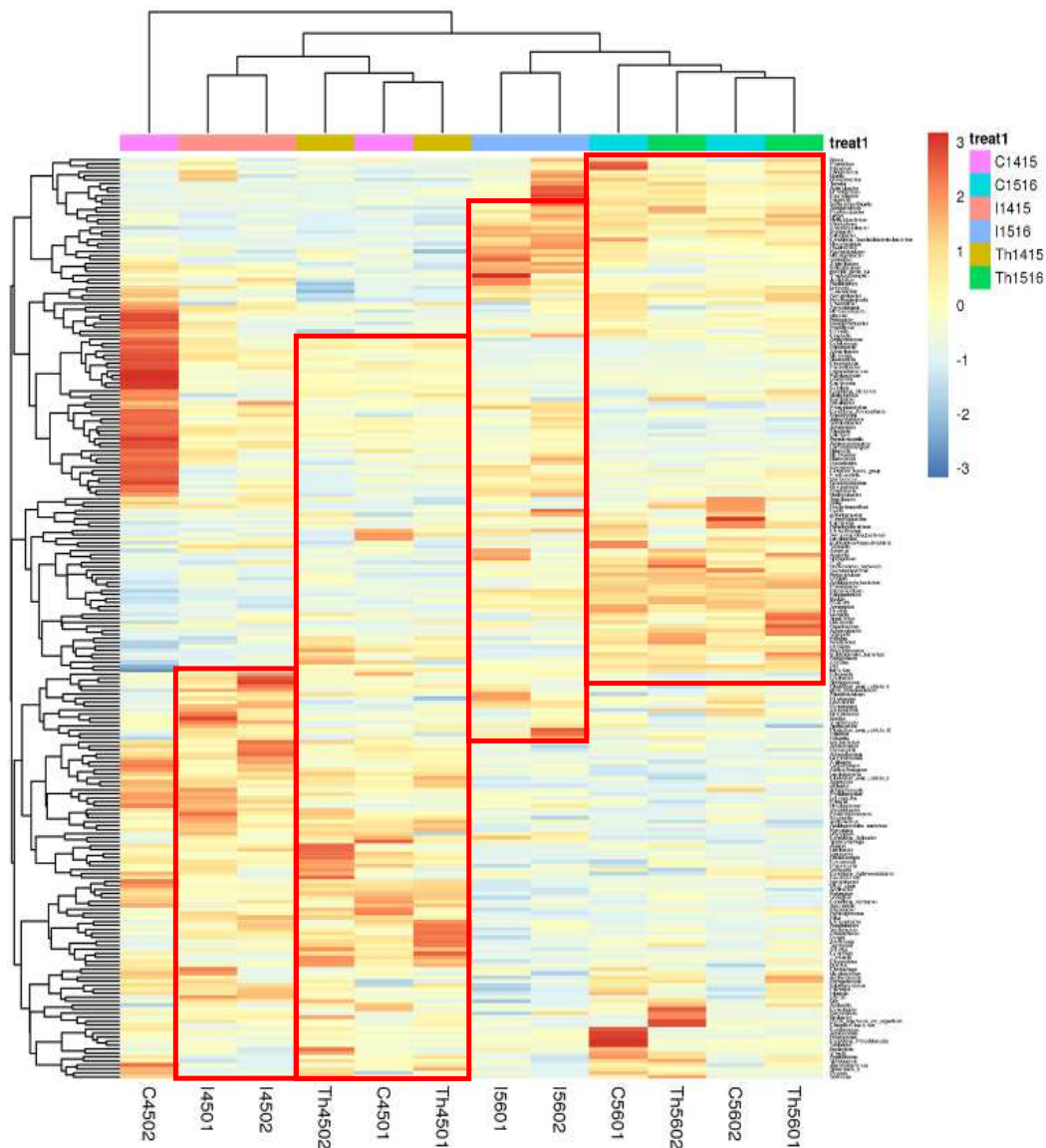


**Figura 48:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a familia bacteriana. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes familias y la agrupación horizontal indica la similitud de las diferentes familias y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

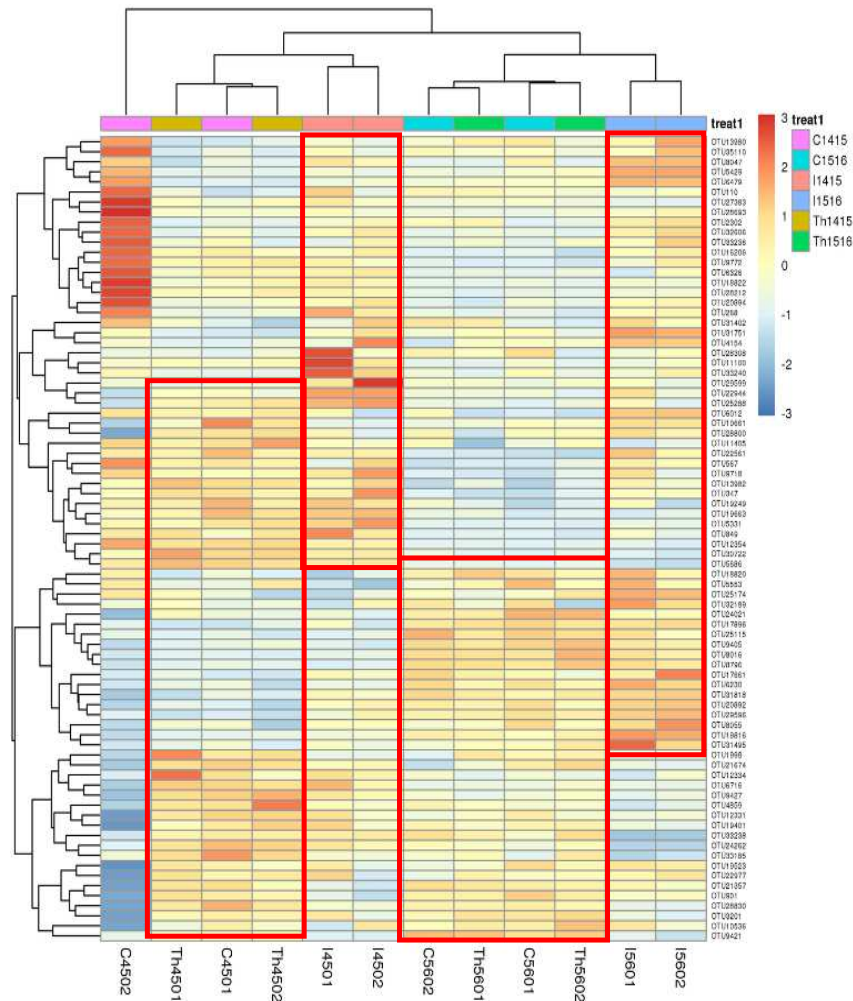
Por último, a nivel de género (Figura 49) y especie (Figura 50) en los mapas de calor se observan los mismos resultados a los anteriores, es decir, un agrupamiento de las muestras por campañas y luego por tiempo de muestreo. Cabe resaltar que no se observa una disimilitud considerable entre los tratamientos. En este caso, también, se



marcaron con un cuadro rojo aquellas muestras que presentaron similitudes en composición como en abundancia.



**Figura 49:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a género bacteriano. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes géneros y la agrupación horizontal indica la similitud de los diferentes géneros y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



**Figura 50:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a especie bacteriana. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes especies y la agrupación horizontal indica la similitud de las diferentes especies y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

#### 4.7.2.1.4. Análisis de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas del suelo

La diversidad microbiana puede evaluarse dentro de una comunidad (diversidad alfa) o entre las colecciones de muestras (diversidad beta). Para inferir la diversidad alfa se calcularon cuatro índices: "Chao1 y Ace" que simplemente estiman el número de especies en una comunidad y "Shannon y Simpson" contemplan tanto la riqueza como la

abundancia de una comunidad. La relación entre los índices de Chao1, Ace y Shannon es inversamente proporcional al índice de Simpson. Es decir, que mientras mayores son los índices Chao1, Ace y Shannon, menor es el valor del índice de Simpson, lo que indica una mayor diversidad de especies. Además, el índice de cobertura fue de 0,99 para todas las muestras de la biblioteca, mientras mayor sea su valor, mayor será la probabilidad de que se detecte la secuencia en la muestra y menor será la probabilidad de no ser detectada. Este índice reflejó que los resultados de la secuenciación representaron la situación real de los microbios en la muestra.

Se puede observar en base al análisis de los valores de la tabla 10 que los valores promedio de los índices de Shannon entre los dos tratamientos (Control y peleteado) no presentan diferencias estadísticamente significativas. En ambas campañas se observa un incremento estadísticamente significativo en los valores promedios de  $H'$  en las muestras tomadas a cosecha con respecto a la condición inicial, a excepción del tratamiento control de la campaña 2014-2015 que no presentó diferencias con ninguna de las muestras dentro de la campaña. Es importante resaltar que para ambas campañas, las muestras provenientes de las parcelas del tratamiento peleteado, presentaron la mayor diversidad (mayores valores promedio de  $H'$ ). Para los valores promedios de los índices de Simpson (Tabla 11) no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos, inclusive no se encontró diferencias con la condición inicial del lote, en ambas campañas. Además, dentro de la tabla 11, se pueden observar los índices de ACE y Chao 1, para los cuales no se encontraron diferencias entre ningunos de los valores de la campaña 2014-2015. Aunque, para la campaña 2015-2016 se observó un aumento estadísticamente significativo en las dos muestras tomadas a cosecha, con respecto a la muestra de la condición inicial en ambos índices.

**Tabla 10:** Índices de Shannon ( $H'$ ) obtenidos para las comunidades bacterianas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.

Tratamientos	Índice de Shannon ( $H'$ ) Bacterias Campaña 2014-2015	Índice de Shannon ( $H'$ ) Bacterias Campaña 2015-2016
Pre Siembra	6,53±0,02 <sup>a</sup>	6,57±0,02 <sup>a</sup>
C	6,59±0,03 <sup>ab</sup>	6,66±0,01 <sup>b</sup>
Th	6,64±0,01 <sup>b</sup>	6,67±0,01 <sup>b</sup>

Los números después de “±” corresponden a los desvíos estándar. Las letras iguales o diferentes indican si hubo diferencias estadísticamente significativas. C: tratamiento control, Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los índices fueron obtenidos con Mothur (Versión 1.30).

**Tabla 11:** Índices de diversidad alfa obtenidos para las comunidades bacterianas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.

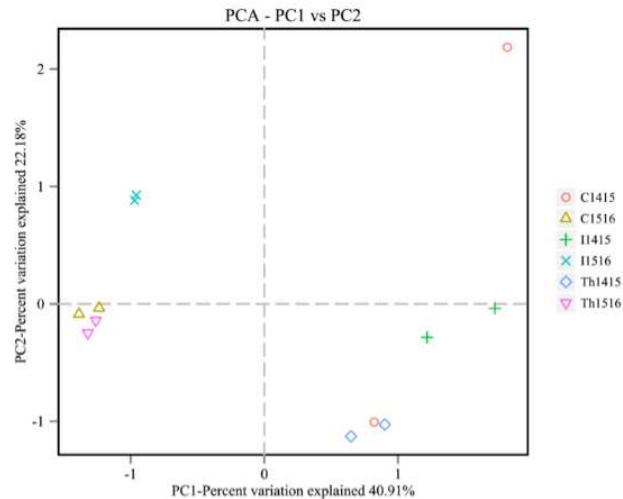
Campañas	Tratamientos	Bacterias		
		ACE	Chao1	Simpson
2014-2015	Pre Siembra	2151,28±44,31 <sup>a</sup>	2156,90±26,32 <sup>a</sup>	0,0040±0,0006 <sup>a</sup>
	C	2138,07±57,64 <sup>a</sup>	2166,03±31,72 <sup>a</sup>	0,0034±0,0002 <sup>a</sup>
	Th	2146,60±19,06 <sup>a</sup>	2163,33±24,99 <sup>a</sup>	0,0030±0,0001 <sup>a</sup>
2015-2016	Pre Siembra	2111,93±14,88 <sup>a</sup>	2128,44±13,12 <sup>a</sup>	0,0032±0,0002 <sup>a</sup>
	C	2172,74±10,02 <sup>b</sup>	2186,56±11,79 <sup>b</sup>	0,0028±0,0001 <sup>a</sup>
	Th	2182,70±10,49 <sup>b</sup>	2199,73±9,69 <sup>b</sup>	0,0028±0,0001 <sup>a</sup>

Los números después de “±” corresponden a los desvíos estándar. Las letras iguales o diferentes indican si hubo diferencias estadísticamente significativas. C: tratamiento control, Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los índices fueron obtenidos con Mothur (Versión 1.30).

#### 4.7.2.1.5. Análisis de la diversidad beta de las comunidades bacterianas del suelo

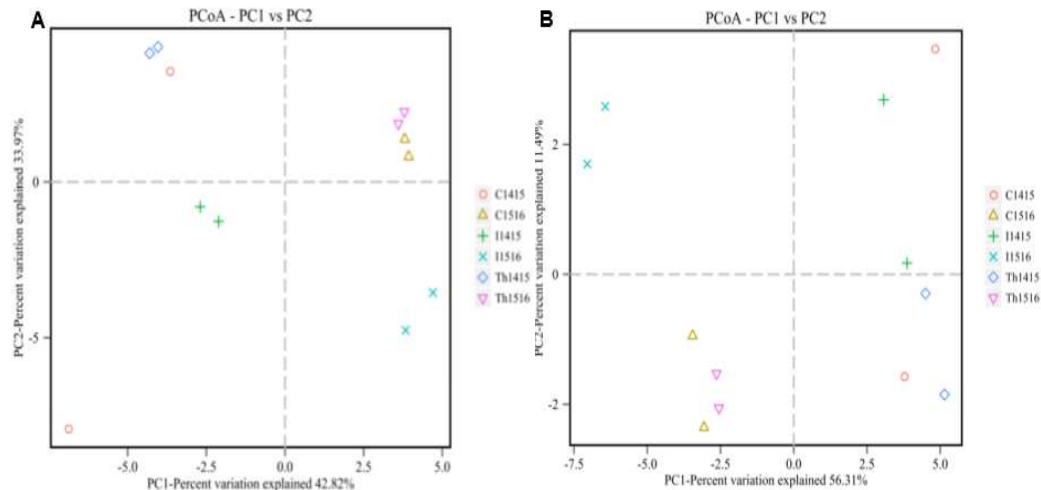
Como se puede observar en la Figura 51, las muestras sufren un primer agrupamiento por campañas/lotes, es decir quedan del lado izquierdo de la componente del eje X todas las muestras correspondientes a la campaña 2015-2016 y del lado derecho (de la misma componente) se agrupan las muestras correspondientes a la campaña 2014-2015. Esto estaría diciendo que las mayores variaciones de los filos bacterianas se habrían presentado entre los diferentes lotes/años. Luego siguiendo con el análisis, se puede observar para los datos de la campaña 2015-2016 que se separan entre los diferentes tiempos de toma de las muestras. Esto es, quedan las muestras de la condición inicial (I56) en un cuadrante y las muestras tomadas a cosecha en el otro (C56 y Th56). Por lo tanto, la aplicación de *Trichoderma* peleteado en la semilla no estaría afectando a las comunidades bacterianas del suelo rizosférico en el lote. Por otro lado, para la campaña 2014-2015 no se observa variaciones entre las muestras tomadas antes de la siembra y a cosecha, como se puede observar se encuentran dentro del mismo cuadrante. La excepción es una muestra correspondiente a una de las réplicas del tratamiento Control (C45) que es la única que se separa del resto, esto podría ser complementario al análisis de los gráficos de abundancias relativa y mapas de calor detallados anteriormente. En donde se observó que una réplica del control peleteado mostraba siempre la mayor variación en las abundancias relativas en los diferentes niveles de clasificación.





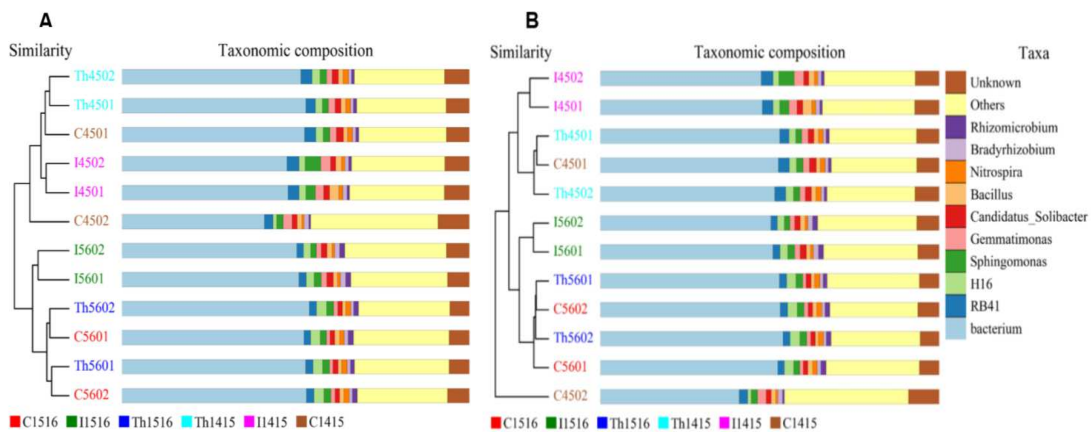
**Figura 51:** Análisis de componentes principales sobre la abundancia relativa del filo bacteriano. Cada punto coloreado representa una muestra, trazada por una componente principal en el eje X y otra componente principal en el eje Y. El porcentaje representa el valor de la contribución de los componentes principales a las diferencias de las muestras. En donde I: condición inicial; C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. Los números 01 y 02 corresponden a las réplicas.

Como se puede observar en las Figuras 52 A y B la distribución de las muestras es la misma tanto para el análisis basado en unifracs ponderado como no ponderado. En ambos gráficos las muestras sufren una primera gran separación por años de campañas (2014-2015 y 2015-2016), luego se separan por el tiempo de toma de muestras, es decir se separan en muestras tomadas antes de la siembra y luego de la cosecha. Lo interesante es observar que tanto los tratamientos peleteados como controles se agrupan dentro del mismo cuadrante, lo que está diciendo que no hay variaciones entre las comunidades al aplicar el bioproducto. Al igual que en el análisis de componentes principales a nivel de filo bacteriano (Figura 51) una de las réplicas del tratamiento control de la campaña 2014-2015 parece no tener la diversidad esperada, ya que se parece más a las comunidades bacterianas previas a la siembra, que a su réplica de bloque tomada en el mismo momento.



**Figura 52:** Análisis de PCoA basado en unifracs ponderado (A) y unifracs no ponderado (B). Cada punto coloreado representa una muestra, trazada por una componente principal en el eje X y otra componente principal en el eje Y. El porcentaje en cada eje indica el valor de la contribución a la discrepancia entre las muestras. En donde I: condición inicial; C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. Los números 01 y 02 corresponden a las réplicas.

Analizando los dendrogramas (Figura 53 A y B) se puede observar que para la campaña 2015-2016 se da una primer separación de las muestras teniendo en cuenta el momento del muestreo, por un lado se encuentran las muestras tomadas previo a la siembra o condición inicial y por el otro las muestras de los tratamientos (control y peleteado) tomadas a cosecha. Luego, entre los tratamientos se observan similitudes entre las réplicas de ambos. Para la campaña 2014-2015 ocurre algo similar, y al igual que los análisis previos (Fig. 51 y 52) una de las réplicas del Control peleteado es la que presenta la mayor variación con respecto a las demás muestras. Teniendo en cuenta que el método no ponderado solo mide presencia ausencia (Figura 53A) esto indicaría que el tipo de los microorganismos presentes en la réplica conflictiva es más similar al lote de la campaña 2014-2015, lo cual era de esperar. Pero analizando la Figura 75 B (ponderado) al tener en cuenta no solo la presencia y ausencia de los microorganismos sino también la abundancia, se puede observar que esta réplica es la que presenta la mayor diversidad comparado con todas las muestras. El resto de las muestras de la campaña 2014-2015 se separan en primer instancia por el momento de muestreo (pre siembra y post cosecha). Por otro lado, si bien en la Figura 53A los tratamientos se separan entre peleteado y control, en la Figura 53 B se muestra que la réplica del tratamiento control es muy similar en tipo y abundancia de géneros bacterianos a las réplicas del tratamiento peleteado.

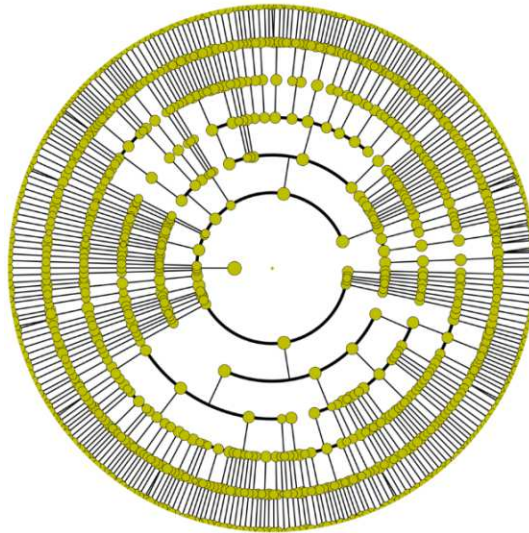


**Figura 53:** Integración del árbol de agrupación UPGMA y el histograma de la abundancia del nivel de género bacteriano, basado en unifracs no ponderado (A) y unifracs ponderado (B). Dendrograma realizado con el algoritmo UPGMA (izquierda) y el mapa de abundancia relativo a nivel de género (10 géneros) a la derecha. En donde I: condición inicial; C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. Los números 01 y 02 corresponden a las réplicas.

#### 4.7.2.1.6. Análisis estadístico de los datos del estudio de diversidad bacteriana por secuenciación masiva de amplicones

En el cladograma de la figura 54 se representan en los círculos, visto desde adentro hacia afuera, el nivel de clasificación de filo a especie. Cada círculo pequeño en los diferentes niveles de clasificación representa una clasificación debajo del nivel y el diámetro de cada círculo es proporcional a la abundancia del taxón. Las diferencias se representan en el color de la clase más abundante, el color amarillo significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las muestras.

Los análisis de ANOVA y Test de Wilcox indicaron que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los filos, clases, órdenes, familia, géneros y especies bacterianas de las muestras de los suelos agrícolas para las campañas 2014-2015 y 2015-2016.



**Figura 54:** Cladograma LEfSe que informa las diferencias entre taxones bacterianos. Los círculos desde afuera hacia adentro representan los diferentes niveles de clasificación desde filo a especie. El diámetro de cada círculo es proporcional a la abundancia de cada taxón. El color amarillo representa que no hubo diferencias estadísticamente significativas, es decir no se encontró un marcador con una puntuación mayor a 4 ( $LDA > 4$ ).

#### 4.7.2.2. Análisis de la diversidad fúngica

##### 4.7.2.2.1. Secuencias y OTUS obtenidas

Al igual que para el estudio de diversidad bacteriana se obtuvieron una gran cantidad de datos, como se puede observar en la tabla 12, se obtuvo en promedio 80.000 lecturas por muestra con un tamaño promedio de 240 pb aprox. Luego del proceso de limpieza de las Lecturas EA quedaron alrededor de 71.000 secuencias efectivas por muestras (estas secuencias son aquellas que se utilizan para continuar con el estudio de diversidad) con un porcentaje de 89% con respecto a las lecturas que salieron directamente del equipo. El porcentaje GC de las secuencias fue muy similar en todas las muestras (44% aprox. Tabla 12). Los controles de calidad de las secuencias (Q20 y30) muestran que aprox. el 99% de las secuencias tiene como máximo 1 error cada 100 bases incorporadas y que aprox. el 98% de las secuencias tiene como máximo 1 error cada 1000 bases incorporadas. Los valores al estar cerca del 100% indican que las secuencias obtenidas tienen una muy baja tasa de error.

**Tabla 12:** Datos de las secuencias obtenidas para el estudio de diversidad fúngica por secuenciación masiva de amplicones correspondientes a las muestras de suelo de las campañas 2014-2015 y 2015-2016.

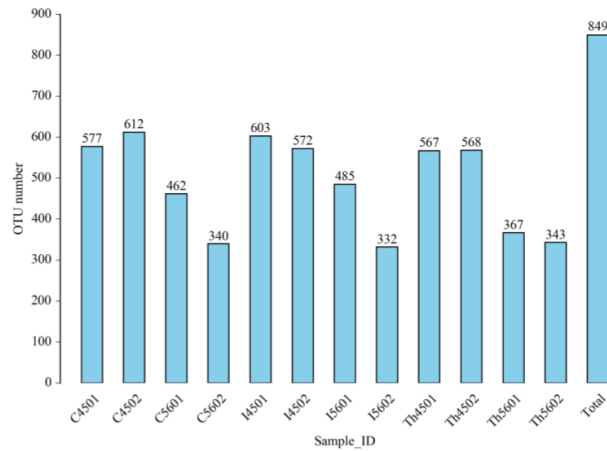
Muestra	Lecturas EA	Etiquetas crudas	Etiquetas limpias	Etiquetas efectivas	Tamaño promedio (pb)	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)	Etiquetas efectivas (%)
C4501	80.111	74.591	72.337	71.446	244	45,18	99,36	98,28	89,18
C4502	79.684	74.612	72.421	71.424	241	46,20	99,44	98,44	89,63
C5601	79.781	75.411	73.133	71.729	244	45,20	99,44	98,47	89,91
C5602	79.915	75.645	73.504	71.454	259	46,19	99,22	98,05	89,41
I4501	79.963	75.124	72.923	71.294	246	46,01	99,41	98,39	89,16
I4502	80.517	75.381	73.137	72.004	250	46,12	99,32	98,21	89,43
I5601	79.586	75.028	72.808	70.272	259	44,54	99,17	97,96	88,30
I5602	80.021	75.470	73.304	71.852	268	46,38	99,10	97,79	89,79
Th4501	79.923	74.601	72.398	71.447	246	46,42	99,39	98,34	89,39
Th4502	80.122	74.882	72.580	70.948	246	45,59	99,38	98,31	88,55
Th5601	79.933	75.469	73.312	70.059	254	43,76	99,27	98,15	87,65
Th5602	79.886	75.506	73.342	71.619	253	44,47	99,28	98,17	89,65

Lecturas EA: Lecturas de extremos apareados (EA) obtenidas de la plataforma de secuenciación.

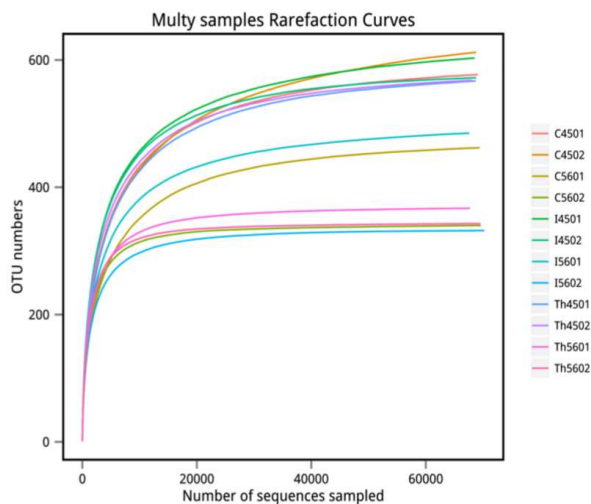
Etiquetas crudas: Corresponden a las etiquetas fusionadas. Etiquetas limpias: las etiquetas después del control de calidad. Etiquetas efectivas: Son las etiquetas sin secuencias químicas que pueden ser utilizados para los análisis posteriores. Tamaño promedio: la longitud promedio de las etiquetas efectivas. GC (%): porcentaje de G y C. Q20% y Q30%: porcentaje de bases con un índice de calidad igual o superior a 20 (tasa de error <1%) y 30 (tasa de error <0,1%). Etiquetas efectivas (%): Porcentaje de etiquetas efectivas con respecto a las Lecturas EA.

Para las 12 muestras se obtuvieron entre 330 a 610 OTUs aproximadamente (Figura 55), cada uno de ellos son grupos de variantes de secuencias similares (97%) a la secuencia del gen marcador ITS. Cada uno de estos grupos está destinado a representar una unidad taxonómica de una especie o género de hongo dependiendo del umbral de similitud de secuencia. La cantidad de OTUs obtenidos no fue muy homogénea teniendo en cuenta todas las muestras, pero los OTUs son similares para las diferentes campañas (2014-2015 y 2015-2016). En la campaña 2014-2015 se obtuvieron mayores números de OTUs comparado a la campaña sucesiva. Esto puede deberse, quizá, a que ese lote presentaba una mayor diversidad fúngica o que para ese periodo se presentaron condiciones ambientales más favorables para obtener una mayor diversidad fúngica.

Con respecto a las curvas de rarefacción (Figura 56) se puede observar que la cantidad de OTUs fúngicas obtenidas para cada una de las muestras son suficientes para realizar los estudios de diversidad microbiana y representan correctamente a las comunidades fúngicas del suelo, ya que las curvas alcanzan una meseta hacia el final de las mismas. Además, en este gráfico se puede observar la disparidad en el número de OTUs obtenidas por muestra, al igual que en el gráfico anterior (Fig. 55).



**Figura 55:** Distribución del número de OTUs fúngicos obtenidos por cada muestra. Dentro de las muestras, C: tratamiento control, I: condición inicial o pre siembra y Th: inoculación de las semillas con *T. harzianum* ITEM 3636 por peleteo. 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. 01 y 02 corresponden al número de las réplicas.



**Figura 56:** Curvas de rarefacción de las OTUs fúngicas obtenidas en el experimento de secuenciación masiva de amplicones para todas las muestras. En donde I: condición inicial; C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. Los números 01 y 02 corresponden a las réplicas.

#### 4.7.2.2. Distribución de abundancias relativas fúngicas

En los siguientes histogramas se representa las abundancias relativas a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie fúngica. Cada color representa un taxón y la longitud de los bloques de color indica la proporción de la abundancia relativa de cada

uno. En cada uno de los gráficos se representan los 10 taxones más representativos de las muestras.

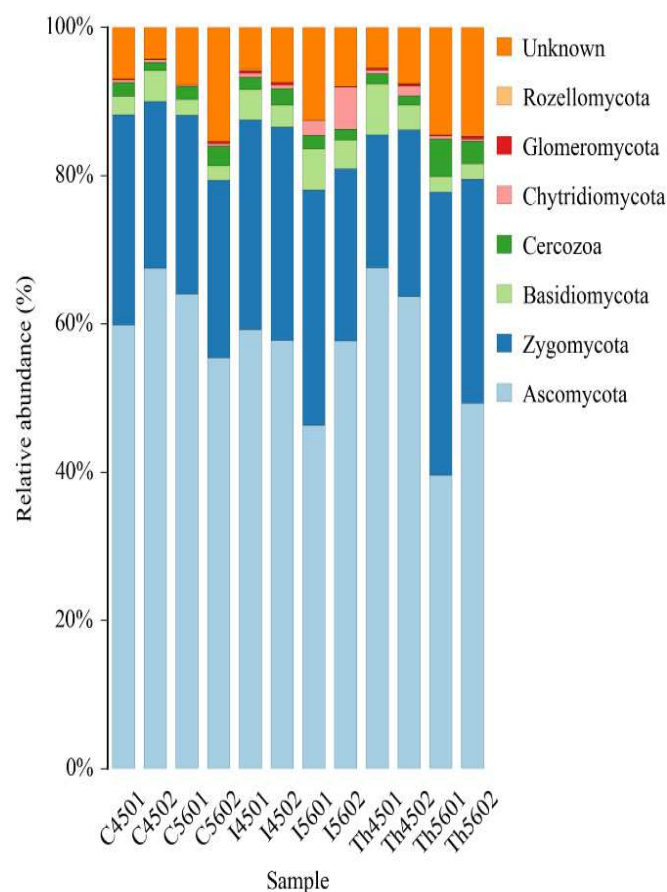
En el histograma y la tabla, de la Figura 57, se muestra las distribuciones de abundancias relativas correspondiente a cada taxón clasificados a nivel de filo. Dentro del filo Desconocido se encuentran fillos no clasificados y desconocidos. El filo más preponderante en las muestra es el de los *Ascomycotas* y su abundancia varió entre 39,5% (Th5601) y 67,5% (C4502), se puede observar que para el caso de las muestras de la campaña 2015-2016 el valor de los porcentajes es menor comparado a la campaña 2014-2015. Quizá puede ser debido a la diferencia en el número de OTUs que se obtuvieron en cada caso. Luego, en orden decreciente de valores de porcentaje de abundancias relativas, encontramos el filo de los *Zygomycotas*, y las muestras presentan porcentajes desde 18% (Th4501) a 38% (Th5601), pero sacando estos valores extremos, en el resto de las muestras hubo poca variación en los porcentajes, aunque hubo una variación estadísticamente significativa de este filo entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado en la campaña 2014-2015. El filo de los *Basidiomycotas* presenta una variación entre las muestras de 2% (C5602) a 6,9% (Th4501), para este filo hubo una menor representación en las muestras de ambos tratamiento (Control y peleteado) tomadas a postcosecha en la campaña 2015-2016, lo cual reflejó una diferencia estadísticamente significativa con la condición pre siembra de la misma campaña. Con respecto al filo *Chytridiomycota* los valores de los porcentajes estuvieron entre 0,2% (C5601) a 5,7% (I5602), aunque hay una amplia diferencia entre estos valores, solo son una réplicas de cada tratamiento, en general este filo no presentó diferencias significativas. Para el filo *Glomeromycota* fue donde se encontró las mayores diferencias, los porcentajes variaron entre 0,03% (I5601) a 0,3%( Th5602), registrándose diferencia significativas entre la condición inicial y el tratamiento peleteado dentro de la campaña 2015-2016. Además, dentro de la campaña 2014-2015, se observaron diferencias significativas entre la condición inicial y el tratamiento control, y de igual modo entre el tratamiento control y el tratamiento peleteado. Aunque es importante aclarar, dado la importancia de este filo, que la abundancia relativa fue mayor en el tratamiento peleteado con respecto al control. En el caso de los *Rozellomycota* fue el primer filo en donde para todas las muestras de una campaña 2015-2016 no se detectó su presencia, mientras que fue observado en una baja proporción para las muestras tomadas en la campaña 2014-2015. Dentro del análisis de hongos se incluyó al filo *Cercozoa* que es un grupo de protistas que incluye a la mayoría de los ameboides y flagelados, y los porcentajes de las abundancias relativas para este filo oscilaron entre 1,1% (C4502) a 5,1%( Th5601). Fue para las 2 réplicas de las muestras tomadas a postcosecha del tratamiento peleteado en

la campaña 2015-2016 donde se observó el mayor porcentaje de este filo y en el resto de las muestras los valores se mantuvieron muy similares. Por último, en el grupo que contiene los fillos denominados como Desconocidos la variación de las abundancias relativas no fue importante (4,32% en C4502 a 15,4 en C5602) aunque cabe destacar que hubo una mayor cantidad de OTUs desconocidos (no se los pudo asignar un filo determinado) en las muestras correspondientes a la campaña 2015-2016 con respecto a la campaña 2014-2015.

Con respecto a la clasificación de clases fúngicas, en la figura 58, se pueden observar las principales clases que presentaron las mayores abundancias relativas obtenidas de las muestras de suelo de ambas campañas. Las mismas fueron: *Sordariomycetes*, *Incertae sedis* (se utiliza para aquellos hongos que presentan posiciones taxonómicas deficientemente establecidas, Trierveiler-Pereira y Baseia, 2009), *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Agaricomycetes*, *Chytridiomycetes*, *Tremellomycetes*, *Pezizomycetes*, *Ustilaginomycetes* y *Glomeromycetes*. En las muestras de la campaña 2014-2015 se observó una variación (Fig. 58) estadísticamente significativa en las clases *Dothideomycetes* y *Eurotiomycetes* entre las muestras de la condición inicial (pre siembra) y las muestras tomadas a los 120 días post siembra (tratamientos Control y peleteado). En el caso de la campaña 2015-2016 se observó diferencias (Fig. 58) en las *Eurotiomycetes* y *Agaricomycetes* entre la condición inicial (pre siembra) y las muestras correspondientes al tratamiento control. También se observó cambios en la abundancia de las *Tremellomycetes* y *Cystobasidiomycetes* (Dentro de "Otros", ver sección anexo) entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado con *T.h.* ITEM 3636.

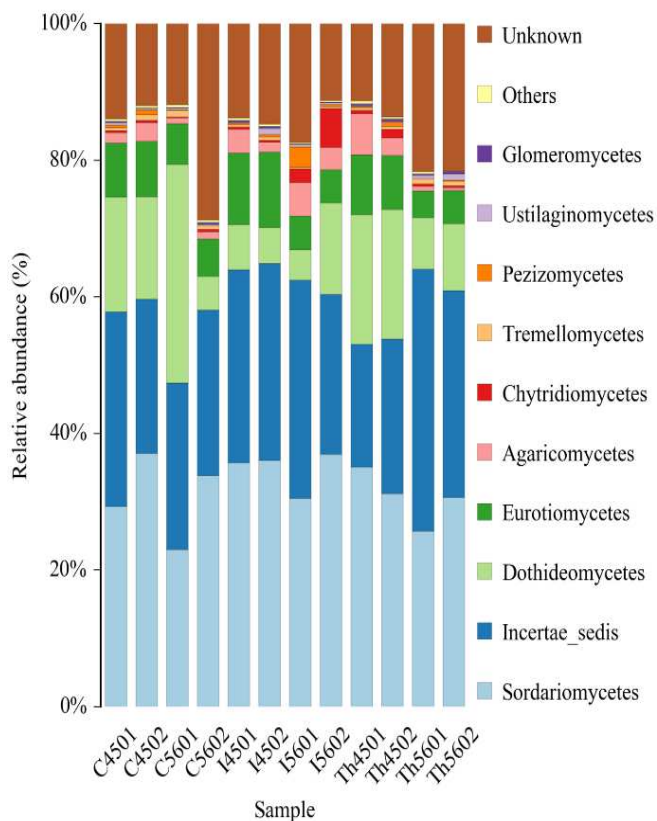
Con respecto al histograma y la tabla para la clasificación de orden fúngico (Figura 59), se puede observar que los 10 órdenes más abundantes en las muestras fueron: *Mortierellales*, *Hypocreales*, *Pleosporales*, *Sordariales*, *Eurotiales*, *Capnodiales*, *Incertae sedis*, *Agaricales*, *Chaetothyriales* y *Onygenales*. En la campaña 2014-2015 se encontró variación (Fig. 59) para los órdenes de los *Pleosporales*, *Incertae sedis*, *Sordariales* y *Glomerales* (Dentro de "Otros") entre la condición pre siembra y el tratamiento control, además entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado se encontró variación (Fig. 59) entre los órdenes *Pleosporales*, *Incertae sedis* y *Chytridiales* (Dentro de "Otros") y entre los tratamientos control y peleteado variaron los *Glomerales*, como ocurrió para la clasificación de filo.





Filó Fúngico	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Ascomycota</i>	59,25	57,76	59,83	67,52	67,61	63,68	46,29	57,69	63,99	55,42	39,58	49,31
<i>Zygomycota</i>	28,22	28,79	28,38	22,47	17,91	22,51	31,73	23,19	24,11	23,96	38,19	30,22
<i>Basidiomycota</i>	4,13	2,99	2,50	4,19	6,88	3,35	5,59	3,93	2,20	1,97	2,06	2,04
<i>Cercozoa</i>	1,66	2,23	1,84	1,10	1,37	1,26	1,82	1,40	1,69	2,59	5,13	3,09
<i>Chytridiomycota</i>	0,59	0,47	0,34	0,33	0,49	1,28	2,00	5,70	0,20	0,36	0,36	0,27
<i>Glomeromycota</i>	0,31	0,31	0,17	0,07	0,27	0,31	0,03	0,08	0,03	0,29	0,19	0,35
<i>Rozellomycota</i>	0,17	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desconocidos	5,68	7,39	6,94	4,32	5,47	7,55	12,55	8,00	7,77	15,41	14,49	14,72

**Figura 57:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Filos fúngicos presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



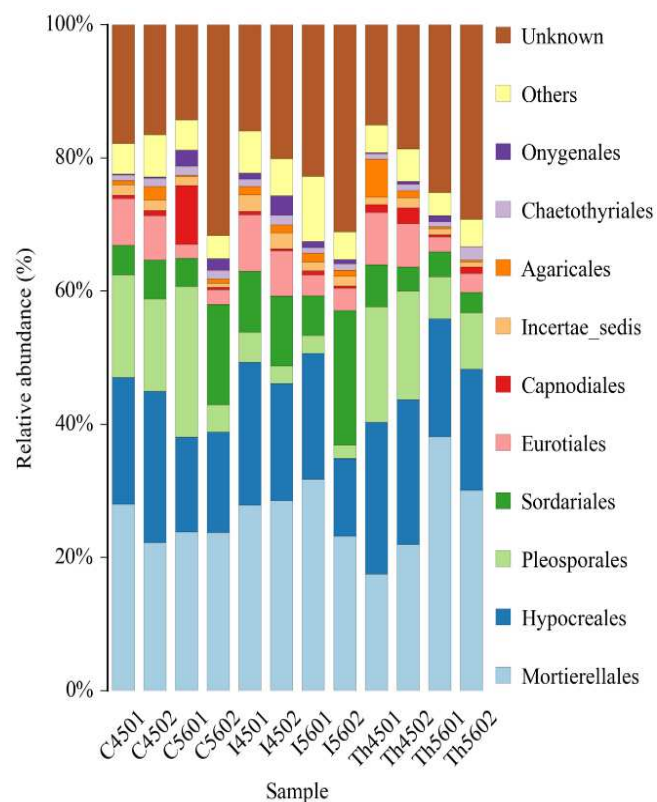
Clase Fúngica	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Sordariomycetes</i>	35,71	36,04	29,33	37,08	35,11	31,17	30,50	36,95	22,96	33,82	25,73	30,64
<i>Incertae_sedis</i>	28,26	28,86	28,43	22,55	17,98	22,62	31,92	23,37	24,37	24,21	38,30	30,27
<i>Dothideomycetes</i>	6,58	5,22	16,81	15,01	18,91	19,00	4,48	13,42	32,05	4,96	7,58	9,75
<i>Eurotiomycetes</i>	10,51	11,10	7,95	8,13	8,77	7,90	4,89	4,89	5,95	5,51	3,88	4,90
<i>Agaricomycetes</i>	3,44	1,44	1,50	2,73	6,07	2,56	4,94	3,24	0,85	1,02	0,71	0,43
<i>Chytridiomycetes</i>	0,35	0,27	0,30	0,31	0,46	1,26	1,99	5,67	0,18	0,36	0,36	0,27
<i>Tremellomycetes</i>	0,41	0,46	0,43	0,90	0,43	0,44	0,22	0,32	0,97	0,51	0,77	0,68
<i>Pezizomycetes</i>	0,19	0,40	0,39	0,64	0,12	0,58	2,97	0,28	0,01	0,00	0,00	0,14
<i>Ustilaginomycetes</i>	0,13	0,85	0,39	0,25	0,18	0,18	0,39	0,27	0,33	0,23	0,46	0,87
<i>Glomeromycetes</i>	0,31	0,31	0,17	0,07	0,27	0,31	0,03	0,08	0,03	0,29	0,19	0,35
Otros	0,31	0,32	0,37	0,35	0,38	0,30	0,26	0,29	0,44	0,33	0,38	0,09
Desconocidos	11,90	12,01	11,78	10,70	9,82	12,29	15,13	9,70	9,98	25,89	15,87	17,06

**Figura 58:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Clases fúngicas presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

Por otro lado, para la campaña 2015-2016 se observó variaciones (Fig. 59) para los órdenes *Eurotiales*, *Chaetothyriales*, *Onygenales* y *Kickxellales* (Dentro de “Otros”) entre la condición pre siembra y el tratamiento control, además entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado variaron (Fig. 59) los órdenes de *Incertae sedis*, *Pleosporales*, *Agaricales* y *Erythrobasidiales* (Dentro de “Otros”). Por último, entre el tratamiento control y peleteado se observó diferencia (Fig. 59) entre los órdenes *Onygenales*, *Hypocreales*, *Diaporthales* y *Kickxellales* (Los dos últimos ordenes están dentro de “Otros”).

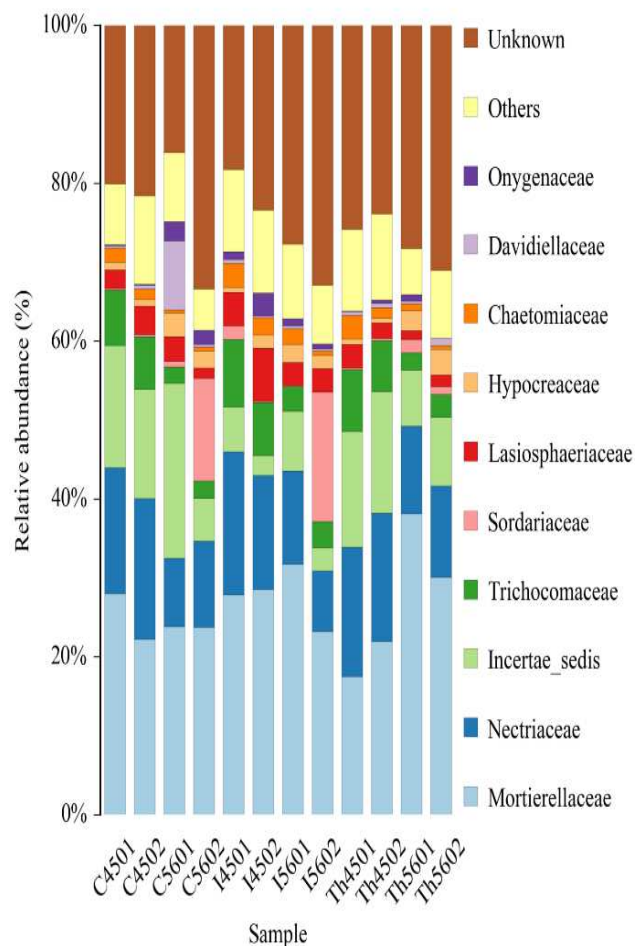
En la figura 60 se observan las 10 familias más abundantes presentes en las muestras y entre ellas se encuentran: *Mortierellaceae*, *Nectriaceae*, *Incertae sedis*, *Trichocomaceae*, *Sordariaceae*, *Lasiosphaeriaceae*, *Hypocreaceae*, *Chaetomiaceae*, *Davidiellaceae* y *Onygenaceae*. Para la campaña 2014-2015 se observó variación (Fig. 60) para las familias *Incertae sedis*, *Glomerellaceae* (Dentro de “Otros”) y *Microascaceae* (Dentro de “Otros”) entre la condición pre siembra y el tratamiento control, además entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado se encontró que variaron (Fig. 60) *Incertae sedis*, *Mortierellaceae*, *Microascaceae* (Dentro de “Otros”), *Pseudeurotiaceae* (Dentro de “Otros”) y *Chaetosphaeriaceae* (Dentro de “Otros”). También, entre los diferentes tratamientos (control y peleteado) las familias en las que se encontró variaciones fueron *Phaeosphaeriaceae*, *Ceratobasidiaceae*, *Niaceae*, *Glomeraceae* y *Chaetothyriaceae* (Todos dentro de “Otros”). Por otra parte, en la campaña 2015-2016 las familias de *Trichocomaceae*, *Onygenaceae*, *Myxotrichaceae* (Dentro de “Otros”) y *Pyronemataceae* (Dentro de “Otros”) presentaron variaciones (Fig. 60) entre la condición pre siembra y el tratamiento control. Además, entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado se encontró cambios (Fig. 60) en las familias de *Lasiosphaeriaceae* y algunas familias dentro de “Otros” (*Togniniaceae*, *Myxotrichaceae*, *Entolomataceae* y *Pyronemataceae*). Con respecto a las diferencias en las familias fúngicas observadas entre los diferentes tratamientos (control y peleteado) solo se observaron para las *Onygenaceae* (Fig. 60) y *Togniniaceae* (Dentro de “Otros”).

En la figura 61 se representan los 10 géneros fúngicos más preponderantes presentes en las muestras, entre los que están: *Mortierella*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Periconia*, *Podospora*, *Chrysosporium* y *Alternaria*.



Orden Fúngico	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Mortierellales</i>	27,87	28,53	27,98	22,23	17,51	21,92	31,72	23,19	23,84	23,72	38,14	30,07
<i>Hypocreales</i>	21,42	17,57	19,06	22,69	22,78	21,74	18,92	11,65	14,23	15,11	17,69	18,18
<i>Pleosporales</i>	4,56	2,66	15,40	13,92	17,36	16,36	2,73	2,02	22,61	4,12	6,29	8,50
<i>Sordariales</i>	9,13	10,51	4,43	5,80	6,35	3,60	5,93	20,26	4,27	15,01	3,81	3,03
<i>Eurotiales</i>	8,49	6,75	7,02	6,68	7,81	6,52	3,14	3,33	2,07	2,28	2,19	2,90
<i>Capnodiales</i>	0,52	0,31	0,50	0,75	1,25	2,41	0,63	0,32	8,82	0,33	0,32	0,91
<i>Incertae sedis</i>	2,48	2,42	1,62	1,60	1,07	1,50	1,32	1,44	1,34	0,61	0,90	0,77
<i>Agaricales</i>	1,28	1,20	0,65	2,03	5,69	1,05	1,29	0,95	0,18	0,61	0,30	0,34
<i>Chaetothyriales</i>	1,05	1,44	0,81	1,29	0,84	0,97	0,87	0,97	1,44	1,31	0,81	1,98
<i>Onygenales</i>	0,95	2,91	0,12	0,16	0,12	0,42	0,88	0,59	2,43	1,79	0,88	0,03
Otros	6,26	5,59	4,57	6,32	4,15	4,80	9,81	4,16	4,46	3,42	3,46	4,10
Desconocidos	14,08	17,39	15,67	15,24	13,56	17,32	20,49	29,60	12,45	28,85	19,43	24,68

**Figura 59:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Orden fúngico presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

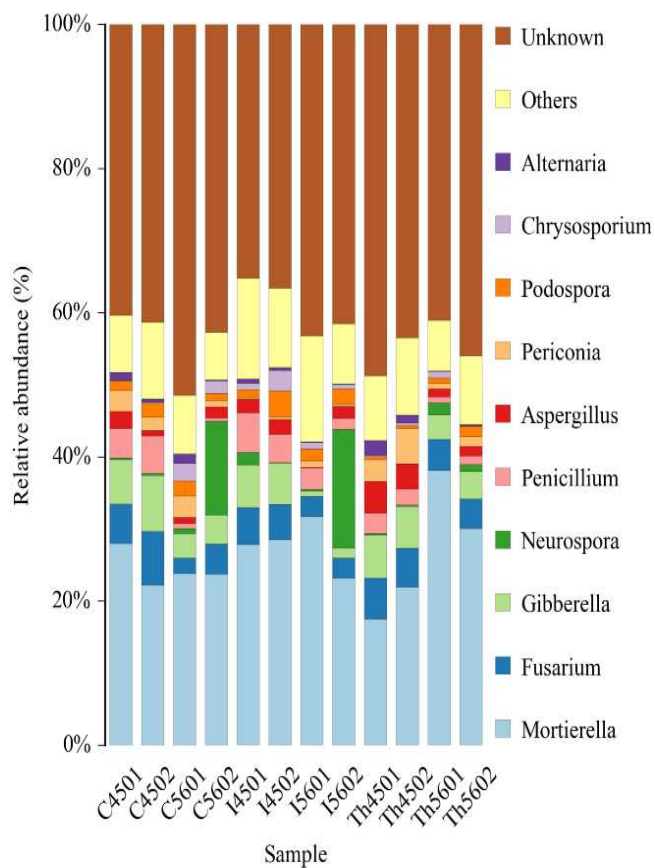


Familia Fúngica	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Mortierellaceae</i>	27,88	28,54	27,99	22,24	17,52	21,93	31,72	23,19	23,84	23,72	38,14	30,07
<i>Nectriaceae</i>	18,10	14,44	16,02	17,84	16,43	16,28	11,81	7,71	8,70	10,91	11,08	11,62
<i>Incertae sedis</i>	5,74	2,52	15,48	13,82	14,66	15,40	7,57	2,91	22,15	5,41	7,12	8,65
<i>Trichocomaceae</i>	8,50	6,75	7,02	6,69	7,81	6,52	3,14	3,33	2,07	2,28	2,19	2,90
<i>Sordariaceae</i>	1,74	0,10	0,22	0,31	0,19	0,24	0,18	16,42	0,68	12,98	1,70	0,98
<i>Lasio-sphaeriaceae</i>	4,26	6,78	2,35	3,59	3,02	1,93	2,92	2,94	3,17	1,31	1,08	1,45
<i>Hypocreaceae</i>	0,65	1,61	0,98	0,83	0,68	0,62	2,27	1,67	2,94	2,11	2,59	3,30
<i>Chaetomiaceae</i>	3,01	2,22	1,75	1,32	3,05	1,35	2,01	0,62	0,41	0,52	0,84	0,50
<i>Davidiellaceae</i>	0,51	0,26	0,33	0,50	0,45	0,53	0,35	0,27	8,79	0,33	0,30	0,88
<i>Onygenaceae</i>	0,94	2,88	0,10	0,15	0,10	0,41	0,88	0,59	2,43	1,79	0,88	0,03
Otros	10,44	10,48	7,72	11,11	10,25	10,88	9,41	7,40	8,69	5,21	5,81	8,59
Desconocidos	16,07	20,54	17,79	20,18	24,18	22,44	25,33	31,22	14,17	30,54	22,47	26,47

**Figura 60:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Familias fúngicas presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

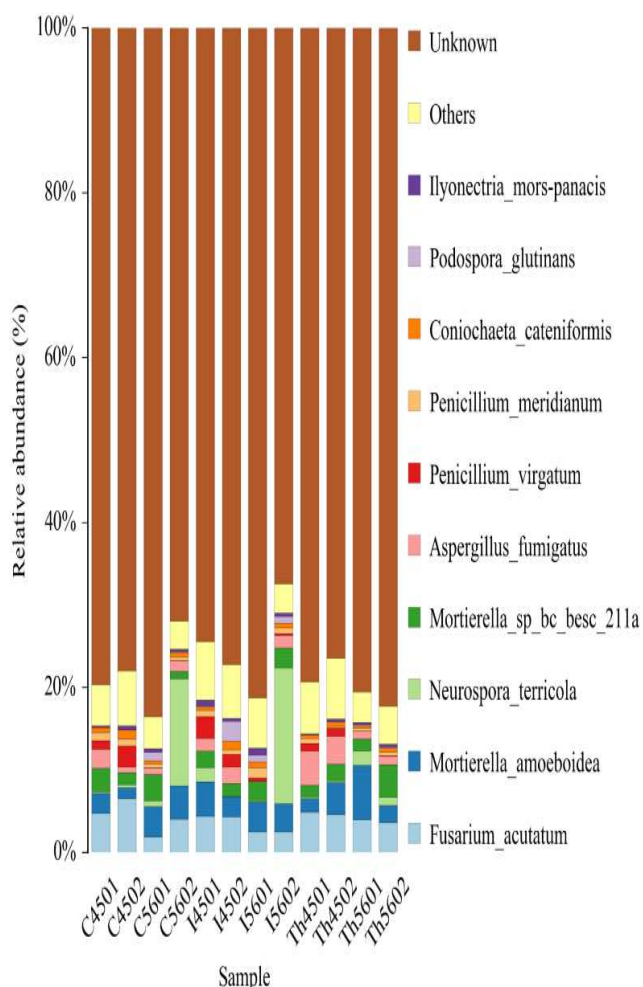
En la campaña 2014-2015 se observó variaciones en los géneros *Pseudaleuria*, *Ochrocladosporium*, *Monacrosporium*, *Pleospora*, *Colletotrichum*, *Thanatephorus*, *Entoloma*, *Pseudogymnoascus* y *Spizellomyces* (Todos ellos dentro de “Otros”) si comparamos la condición pre siembra y el tratamiento control, además si tenemos en cuenta la condición pre siembra y el tratamiento peleteado se encontró variaciones (Fig. 61) para *Aspergillus*, *Periconia*, *Mortierella*, y varios géneros fúngicos dentro de “Otros” (*Thanatephorus*, *Clonostachys*, *Delfinachytrium*, *Pseudogymnoascus*, *Spizellomyces* y *Humicola*). Dentro de esta misma campaña si comparamos los géneros fúngicos que variaron entre el tratamiento control y peleteado encontramos que fueron *Podospora* (Fig. 61) y varios géneros dentro de “Otros” (*Thanatephorus*, *Ochrocladosporium*, *Clonostachys*, *Cyphellophora*, *Flagelloscypha*, *Colletotrichum* y *Purpureocillium*). Mientras que para la campaña 2015-2016 se observaron diferencias para los géneros de *Gibberella* (Fig. 61) y cinco géneros más dentro de “Otros” (*Oidiodendron*, *Sarocladium*, *Microdochium*, *Pseudaleuria* y *Trichoderma*) entre la condición pre siembra y el tratamiento control, también entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado se encontró diferencias (Fig. 61) entre *Fusarium*, *Gibberella* y varios géneros que están agrupados dentro de “Otros” (*Trichoderma*, *Clitopilus*, *Phaeoacremonium*, *Scytalidium*, *Oidiodendron*, *Phialemonium*, *Erythrobasidium* y *Pseudaleuria*). Por último resta decir que los géneros que fueron diferentes entre los tratamientos (Control y peleteado) fueron *Phaeoacremonium*, *Scytalidium* y *Trichoderma* (Dentro de “Otros”). Cabe resaltar que el género *Trichoderma* presentó una mayor abundancia en las muestras provenientes al tratamiento peleteado, con respecto al tratamiento control.

En la figura 62 se describe el histograma y la tabla con las 10 especies con mayores abundancias relativas de las muestras, y son: *Fusarium acutatum*, *Mortierella amoeboides*, *Neurospora terricola*, *Mortierella sp bc besc 211a*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium virgatum*, *Penicillium meridianum*, *Coniochaeta cateniformis*, *Podospora glutinans* y *Ilyonectria mors-panacis*. La mayor abundancia de los filotipos (del 50 al 70%) se identificaron dentro de especies desconocidas, posiblemente sea debido a que en la actualidad las especies fúngicas se determinan secuenciando de dos a tres secuencias de ADN de marcadores moleculares filogenéticos, y la región ITS (que fue la utilizada en este estudio) no resuelve de manera precisa entre especies fúngicas.



Género Fúngico	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Mortierella</i>	27,90	28,56	28,02	22,26	17,53	21,94	31,74	23,20	23,86	23,72	38,15	30,07
<i>Fusarium</i>	5,15	4,85	5,50	7,47	5,71	5,46	2,83	2,79	2,16	4,20	4,28	4,11
<i>Gibberella</i>	5,88	5,80	6,20	7,75	6,01	5,73	0,77	1,40	3,38	4,03	3,39	3,80
<i>Neurospora</i>	1,74	0,10	0,22	0,31	0,19	0,24	0,18	16,42	0,68	12,98	1,70	0,98
<i>Penicillium</i>	5,51	3,84	4,09	5,16	2,84	2,25	2,99	1,55	0,75	0,50	0,85	1,17
<i>Aspergillus</i>	1,84	2,09	2,40	0,77	4,40	3,48	0,04	1,64	0,83	1,54	1,09	1,36
<i>Periconia</i>	0,23	0,37	2,87	1,87	3,04	4,90	0,97	0,27	2,99	0,91	0,73	1,38
<i>Podospora</i>	1,10	3,60	1,35	1,96	0,43	0,39	1,67	2,19	2,08	0,93	0,78	1,40
<i>Chrysosporium</i>	0,94	2,88	0,10	0,15	0,10	0,41	0,88	0,59	2,43	1,79	0,88	0,03
<i>Alternaria</i>	0,58	0,42	1,11	0,45	2,09	1,05	0,07	0,11	1,31	0,09	0,11	0,23
Otros	13,91	10,89	7,76	10,52	8,89	10,63	14,65	8,29	8,05	6,59	6,99	9,48
Desconocidos	33,30	33,88	38,22	40,04	47,26	42,11	40,94	40,01	49,62	39,88	35,27	41,47

**Figura 61:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a géneros fúngicos presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



Especie Fúngica	Tratamientos (%)											
	I4501	I4502	C4501	C4502	Th4501	Th4502	I5601	I5602	C5601	C5602	Th5601	Th5602
<i>Fusarium acutatum</i>	4,37	4,29	4,75	6,51	4,88	4,60	2,48	2,47	1,90	4,02	3,97	3,64
<i>Mortierella amoeboida</i>	4,18	2,45	2,41	1,36	1,68	3,87	3,61	3,46	3,65	4,02	6,59	2,04
<i>Neurospora terricola</i>	1,74	0,10	0,22	0,31	0,19	0,24	0,18	16,43	0,68	12,98	1,70	0,98
<i>Mortierella sp bc besc 211<sup>a</sup></i>	2,02	1,54	2,86	1,50	1,39	1,98	2,34	2,42	3,24	0,92	1,48	3,97
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,55	2,01	2,29	0,71	4,19	3,44	0,00	1,54	0,80	1,36	0,96	1,03
<i>Penicillium virgatum</i>	2,65	1,47	1,01	2,56	0,87	0,96	0,41	0,24	0,04	0,00	0,00	0,10
<i>Penicillium meridianum</i>	0,76	0,61	0,99	0,80	0,65	0,22	1,25	0,71	0,40	0,41	0,40	0,42
<i>Coniochaeta cateniformis</i>	0,40	1,00	0,62	1,11	0,42	0,58	0,69	0,55	0,42	0,50	0,26	0,45
<i>Podospora glutinans</i>	0,16	2,47	0,01	0,03	0,00	0,04	0,87	0,82	1,05	0,19	0,15	0,15
<i>Ilyonectria mors-panacis</i>	0,66	0,31	0,23	0,46	0,13	0,29	0,85	0,40	0,40	0,25	0,24	0,32
Otros	15,13	14,65	11,93	14,36	12,16	16,05	17,02	15,31	14,54	8,58	9,04	11,13
Desconocido	64,47	66,38	70,51	69,00	71,95	66,33	68,02	54,14	71,02	63,93	69,43	71,24

**Figura 62:** Histograma con las abundancias relativas correspondientes a Especies fúngicas presentes en los diferentes tratamientos. El tamaño y el color de cada barra corresponden a la proporción de cada uno de los taxones. Los tratamientos I4501, I4502, I5601 y I5602: corresponden a las muestras obtenidas antes de la siembra (I: inicial). Por otro lado están las muestras tomadas a los 120 días post siembra correspondientes al tratamiento Control (C4501, C4502, C5601 y C5602) y el tratamiento peleteado con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 (Th4501, Th4502, Th5601 y Th5602). Los números 45 y 56 corresponden a las campañas 2014-2015 y 2015-2016 respectivamente, los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.



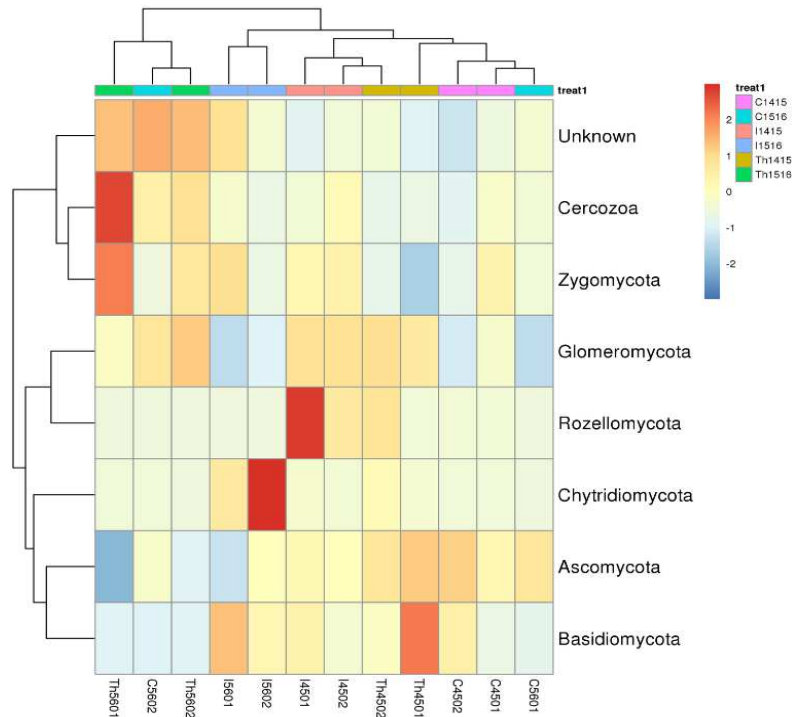
Dentro de los resultados obtenidos para la campaña 2014-2015 se encontró una variación significativa para la especie *Aspergillus fumigatus* entre la condición inicial y el tratamiento peleteado (Fig. 62), el resto de las discrepancias encontradas entre todas las muestras se encontraron en especies agrupadas dentro de “Otros” (se detalla en la sección anexa). Por otro lado, para la campaña 2015-2016 se encontró variaciones en las especies (dentro de las más representativas) de *Podospora glutinans* y *Fusarium acutatum* entre la condición pre siembra y el tratamiento peleteado (Fig. 62), al igual que para la campaña anterior la mayoría de las variaciones estuvieron en las especies dentro de “Otros” (sección anexa).

#### **4.7.2.2.3. Mapas de calor de abundancias fúngicas para los diferentes niveles taxonómicos**

El análisis de agrupamiento de mapas de calor se realizó a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especies. En los resultados de agrupamientos de mapa de calor, el color representa la abundancia de las diferentes especies. Además el agrupamiento vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes especies, es decir, mientras más corta es la longitud de la rama entre dos especies, mayor es la similitud de las abundancias entre ellas. También, el agrupamiento horizontal indica la similitud del tipo de microorganismo y las abundancias de los mismos en las diferentes muestras, mientras más corta sea la longitud de las ramas entre las muestras, mayor será la similitud entre las mismas.

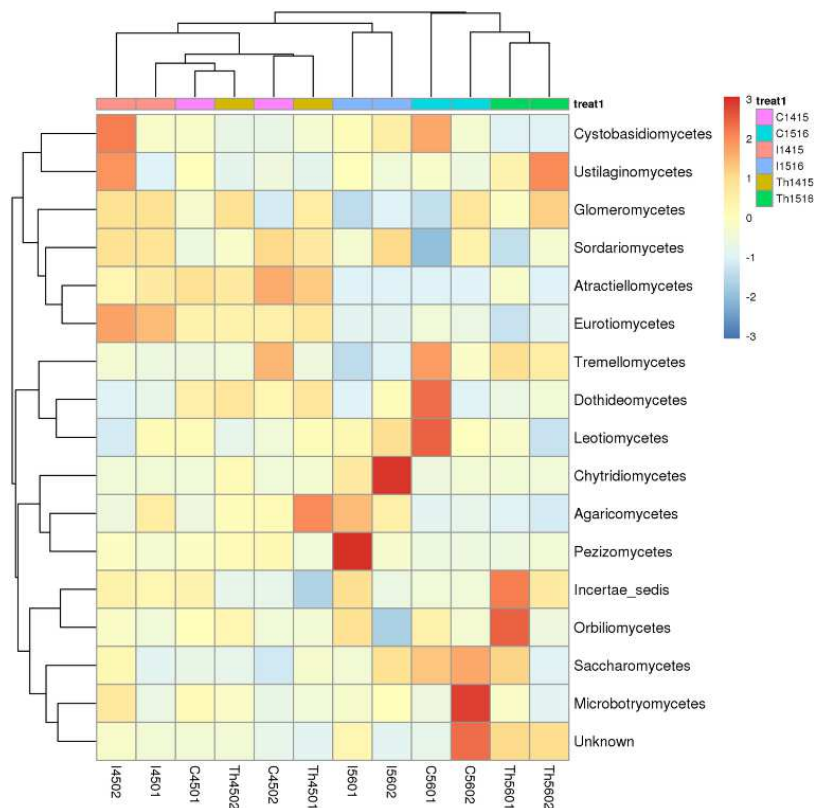
En la Figura 63 se describe el mapa de calor obtenido para filos fúngicos. Si bien para la campaña 2014-2015 se observa un agrupamiento de las muestras, no es una separación muy clara y no se observan patrones específicos o representativos para cada una de las condiciones o tratamientos. La figura muestra que hay una gran variabilidad, inclusive, entre las réplicas.

En el próximo nivel taxonómico, de clases fúngicas (Figura 64), es posible observar que las muestras se separan en las dos campañas diferentes, aunque la condición pre siembra de la campaña 2015-2016 se asemeja más a las muestras de la campaña 2014-2015 que a las muestras de su campaña. Al igual a lo ocurrido con la clasificación de filo, en este caso no se encuentran patrones claros de clases y abundancias fúngicas entre las muestras.



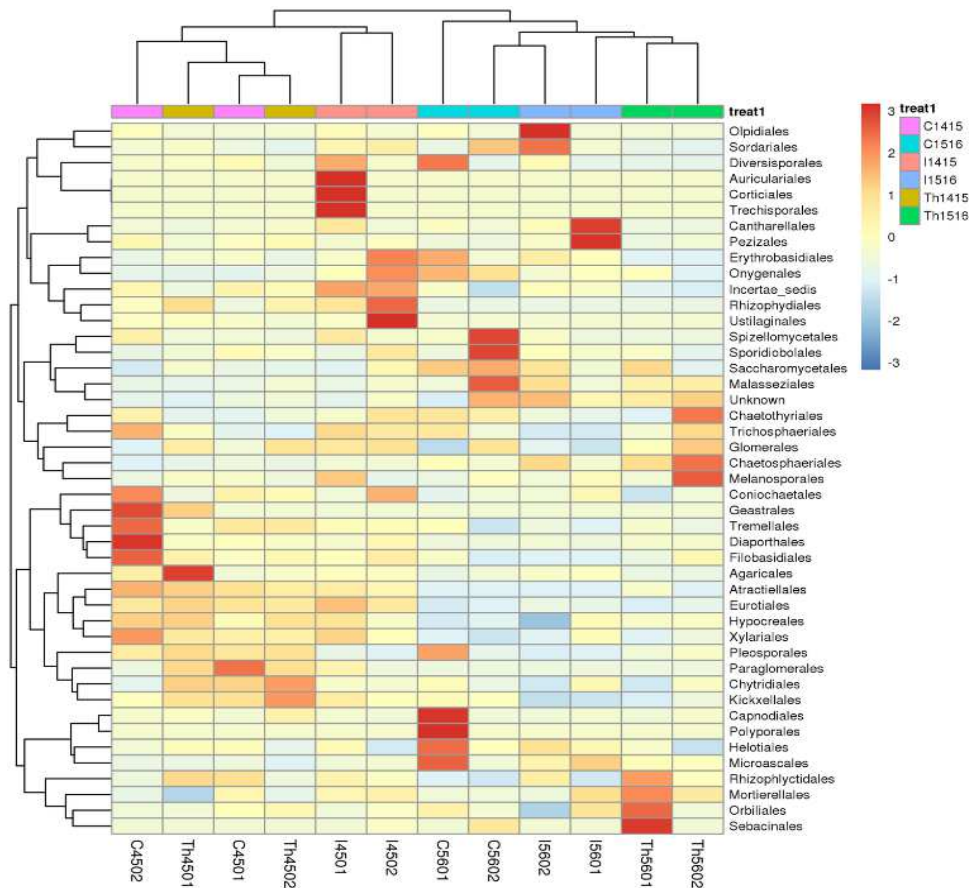
**Figura 63:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a filo fúngico. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes filios y la agrupación horizontal indica la similitud de los diferentes filios y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

En el mapa de calor para la clasificación de orden fúngico (Figura 65) se puede observar una separación entre las muestras por cada una de las campañas. Además, dentro de la campaña 2014-2015 las muestras se agruparon de acuerdo a la fecha de muestreo, esto es, condición inicial y 120 días post siembra. Este último comportamiento no se vio reflejado para la campaña 2015-2016 ya que no se observó una diferenciación manifiesta entre las muestras.



**Figura 64:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a clase fúngica. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes clases y la agrupación horizontal indica la similitud de las diferentes clases y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

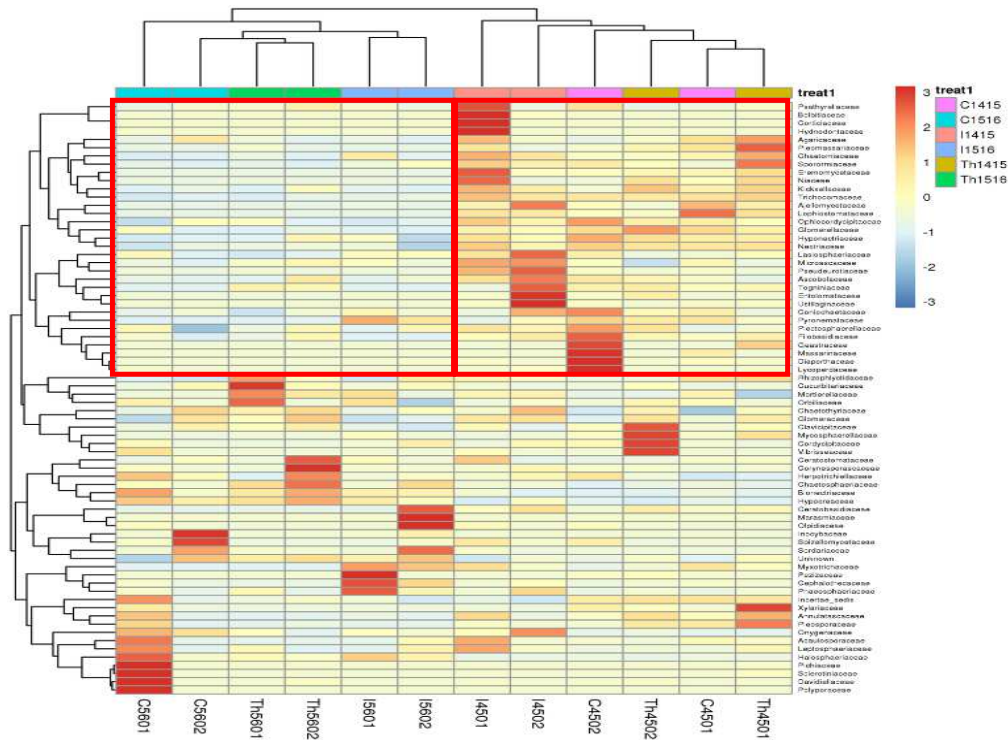
La Figura 66 corresponde al mapa de calor correspondiente a familia fúngica y en él se puede observar que las muestras se separan, en principio, de acuerdo al año de la campaña. En la misma figura, marcadas con un rectángulo rojo se destacan zonas del mapa en donde se observan diferencias entre las abundancias de las familias fúngicas de ambas campañas. Luego, analizando la distribución de las muestras dentro de la campaña 2015-2016 se puede decir que las mismas se separan de acuerdo al tiempo de muestreo, a excepción de una muestra del tratamiento control que presentó un perfil diferente al resto. Por otro lado, dentro de la campaña 2014-2015 no se observó agrupamientos claros entre las muestras ya que la abundancia de estos microorganismos varía entre cada una de las muestras.



**Figura 65:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a orden fúngico. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes órdenes y la agrupación horizontal indica la similitud de los diferentes órdenes y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

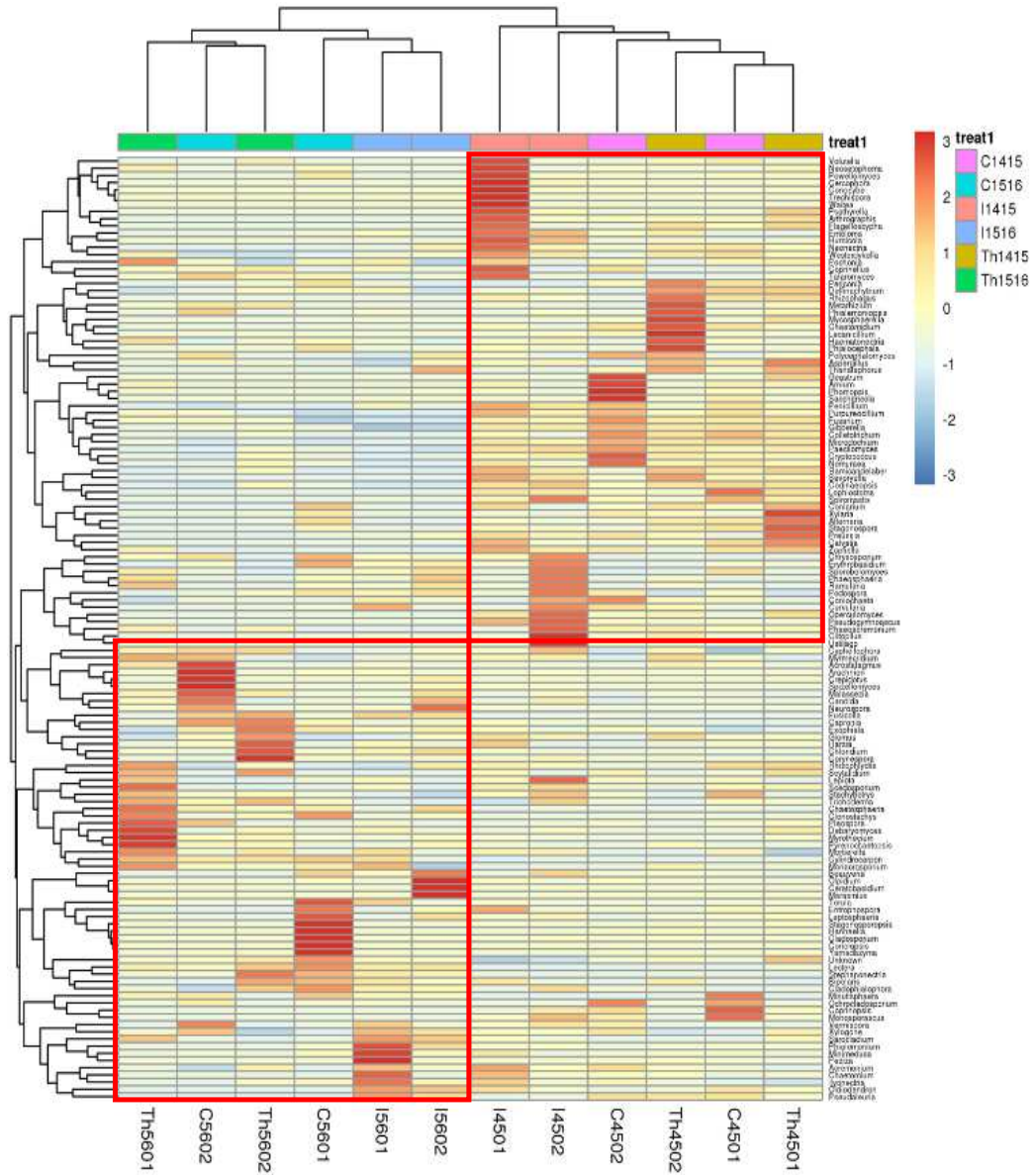
El mapa de calor correspondiente a la clasificación de género (Figura 67) presenta patrones de abundancia propios para cada una de las muestras, inclusive comparado a su réplica. En coincidencia con lo descrito en los niveles superiores de clasificación, se puede observar una marcada variabilidad. Sin embargo, las muestras se logran separar en sus respectivas campañas y se podría considerar una cierta similitud entre las abundancias (en forma de zonas aisladas) de los géneros fúngicos en los cuadrantes marcados con recuadros rojos. Por lo tanto, en cada una de las campañas hubo ciertos

géneros con mayores abundancias que en la otra, de este modo estos grupos de hongos fueron característicos y generan un patrón de comparación entre los dos campos y campañas.



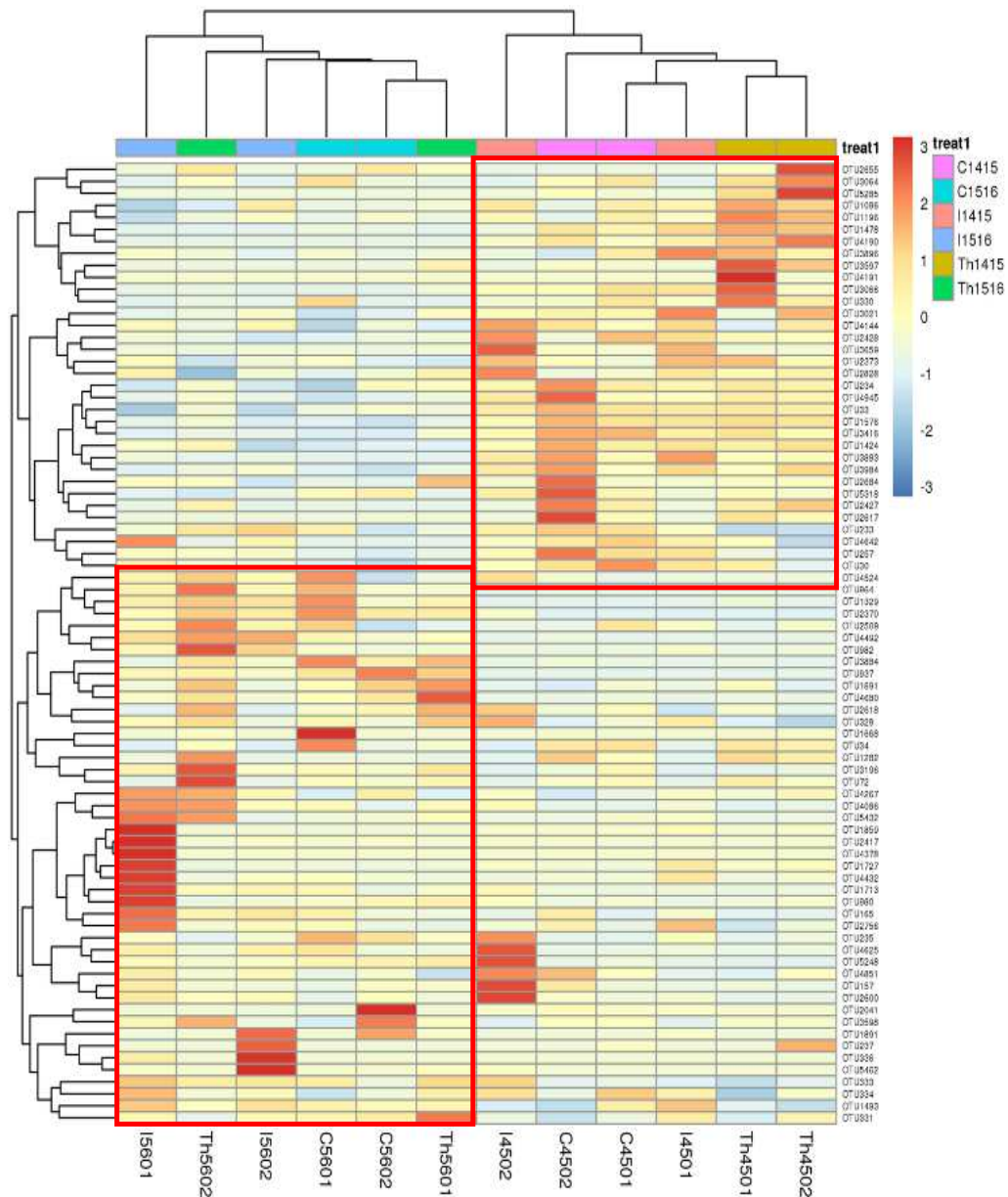
**Figura 66:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a familia fúngica. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes familias y la agrupación horizontal indica la similitud de las diferentes familias y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

El mapa correspondiente a la clasificación de especie fúngica (Figura 67) es similar a lo observado previamente en el mapa de calor de género (Figura 68), en donde se podían observar ciertas similitudes en la abundancia de ciertos microorganismos en cada una de las muestras dentro de una campaña, aunque las muestras presentan variaciones en las abundancias de especies inclusive con su réplica.



**Figura 67:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a género fúngico. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes géneros y la agrupación horizontal indica la similitud de los diferentes géneros y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.





**Figura 68:** Mapa de calor de la abundancia correspondiente a especie fúngica. La agrupación vertical indica la similitud de la abundancia entre diferentes especies y la agrupación horizontal indica la similitud de las diferentes especies y sus respectivas abundancias entre las muestras. Los microorganismos con alta y baja abundancia están indicados por diferente intensidad de color. I45 e I56: muestras obtenidas antes de la siembra (I: condición inicial), 45 y 56: 2014-2015 y 2015-2016, respectivamente. C45, C56, Th45 y Th56: muestras obtenidas 120 días después de la siembra. C: tratamiento de control, Th: inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 01 y 02 corresponden a las diferentes réplicas.

**4.7.2.2.4. Análisis de la diversidad alfa de las comunidades fúngicas del suelo**

Las descripciones de los índices de alfa diversidad son las mismas que para la tabla de diversidad alfa de bacterias (Tablas 10 y 11), y en este caso la cobertura fue de 0,99 para todas las muestras. Se puede observar en base al análisis de los valores de la Tabla 13, que los valores promedios de H' no presentan variaciones estadísticamente significativas entre los tratamientos peleteado y control, aunque la diversidad para el tratamiento peleteado sea mayor con respecto al control (de acuerdo al valor promedio del índice H') en ambas campañas. Además, no se observan variaciones significativas con respecto a las muestras de la condición inicial o pre siembra. Lo mismo ocurre al analizar el valor promedio de los otros índices ACE, Chao1 y Simpson determinados en la Tabla 14, lo cual indica que la cepa de *Trichoderma* no estaría afectando la diversidad de las comunidades fúngicas del suelo.

**Tabla 13:** Índices de Shannon (H') obtenidos para las comunidades fúngicas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.

Tratamientos	Índice de Shannon (H') Hongos Campaña 2014-2015	Índice de Shannon (H') Hongos Campaña 2015-2016
Pre Siembra	4,45±0,03 <sup>a</sup>	4,12±0,35 <sup>a</sup>
C	4,25±0,05 <sup>a</sup>	3,98±0,04 <sup>a</sup>
Th	4,34±0,06 <sup>a</sup>	4,25±0,15 <sup>a</sup>

Los números después de "±" corresponden a los desvíos estándar. Las letras iguales o diferentes indican si hubo diferencias estadísticamente significativas. C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los índices fueron obtenidos con Mothur (Versión 1.30).

**Tabla 14:** Índices de diversidad alfa obtenidos para las comunidades fúngicas en el estudio de secuenciación masiva de amplicones.

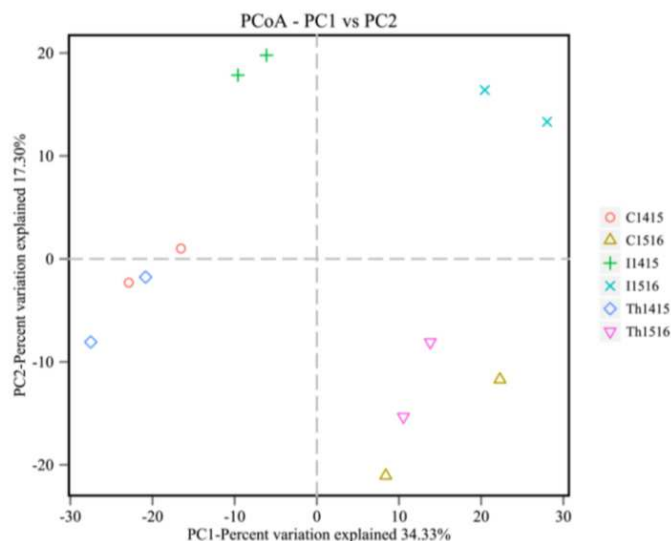
Campañas	Tratamiento	Hongos		
		ACE	Chao1	Simpson
2014-2015	Pre Siembra	601,70±32,86 <sup>a</sup>	605,58±38,82 <sup>a</sup>	0,035±0,003 <sup>a</sup>
	C	620,23±42,34 <sup>a</sup>	621,82±39,34 <sup>a</sup>	0,041±0,006 <sup>a</sup>
	Th	579,67±28,97 <sup>a</sup>	583,01±35,02 <sup>a</sup>	0,032±0,001 <sup>a</sup>
2015-2016	Pre Siembra	414,58±115,30 <sup>a</sup>	417,32±118,96 <sup>a</sup>	0,049±0,016 <sup>a</sup>
	C	405,97±90,49 <sup>a</sup>	415,58±77,19 <sup>a</sup>	0,049±0,005 <sup>a</sup>
	Th	356,21±77,10 <sup>a</sup>	356,31±66,70 <sup>a</sup>	0,035±0,007 <sup>a</sup>

Los números después de "±" corresponden a los desvíos estándar. Las letras iguales o diferentes indican si hubo diferencias estadísticamente significativas. C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los índices fueron obtenidos con Mothur (Versión 1.30).



#### 4.7.2.2.5. Análisis de la diversidad beta de las comunidades fúngicas del suelo

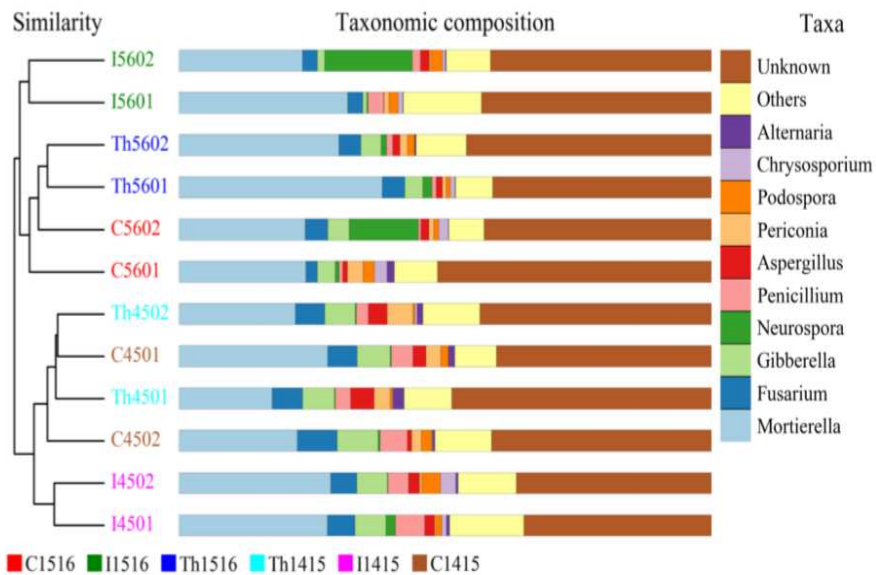
En el análisis PCoA (Figura 69) se puede observar un primer agrupamiento sobre la componente del eje X por año de muestreo. Las muestras de la campaña 2015-2016 se separan, a su vez, por el tiempo de muestro obteniéndose por un lado el grupo de las muestras iniciales y, por el otro lado, las muestras tomadas luego de la cosecha. Es importante destacar que no se observan variaciones entre los tratamientos Control y Peleteado en este análisis, por lo cual la aplicación con *Trichoderma* no estaría afectando la diversidad fúngica. Para la campaña 2014-2015 se obtiene el mismo resultado que para la diversidad bacteriana, en donde, las muestras se separan entre las iniciales y las postcosecha, aunque en una de las réplicas del control peleteado la comunidad de hongos es más similar a la condición pre siembra que a su réplica dentro del tratamiento.



**Figura 69:** Análisis de PCoA basado en Bray Curtis para las comunidades fúngicas del suelo de ambas campañas. Cada punto coloreado representa una muestra, trazada por una componente principal en el eje X y otra componente principal en el eje Y. El porcentaje en cada eje indica el valor de la contribución a la discrepancia entre las muestras. En donde I: condición inicial; C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Los números 45: campaña 2014-2015 y 56: campaña 2015-2016. Los números 01 y 02 corresponden a las réplicas.

Al analizar el dendrograma (Figura 70), se ve la formación de dos grupos claramente diferenciables correspondientes a las diferentes campañas (2014-2015 y 2015-2016). Las muestras de la campaña 2015-2016 se separan entre aquellas que fueron tomadas antes de la siembra y aquellas tomadas a postcosecha. Esta separación se repitió a lo largo del

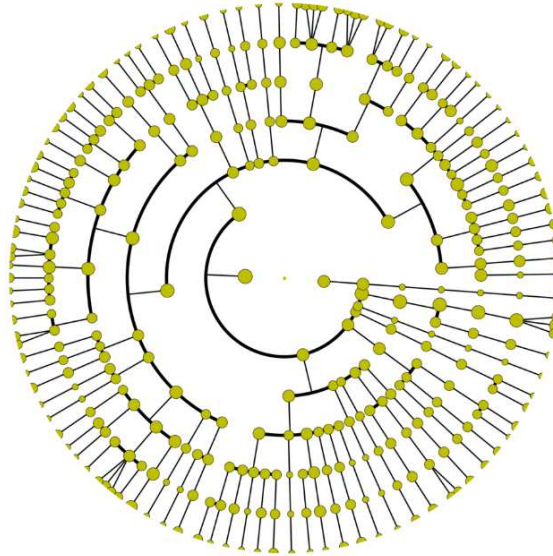
estudio para las dos comunidades estudiadas. Luego, si bien los tratamientos peleteado y control se separan, una de las réplicas del tratamiento control (C5602) es igualmente similar a las muestras del tratamiento peleteado. Esto indicaría que hay una variación muy baja entre los tratamientos. Para la campaña 2014-2015, al igual que los análisis anteriores, las muestras en principio se separan por los tiempos en los que se tomó la muestra. Era lógico esperar esta variación, ya que entre los lapsos de toma de muestra, estuvo presente un cultivo, hubo incidencia del clima, animales, insectos y de las prácticas agrícolas, entre otros factores. En esta campaña los tratamientos (Control y Peleteado) son muy similares ya que se agrupan entre ellos.



**Figura 70:** Integración del árbol de agrupación de UPGMA y el histograma de abundancia de género en el gráfico basado en Bray Curtis. Trazado con el árbol UPGMA a la izquierda y el mapa de abundancia relativo al nivel del género (10 géneros) a la derecha.

#### 4.7.2.2.6. Análisis estadístico de los datos del estudio de diversidad fúngica por secuenciación masiva de amplicones

En el cladograma de la Figura 71 se representan en los círculos, visto desde adentro hacia afuera, el nivel de clasificación de filo a especie. Cada círculo pequeño en los diferentes niveles de clasificación representa una clasificación debajo del nivel y el diámetro de cada círculo es proporcional a la abundancia del taxón. Las diferencias se representan en el color de la clase más abundante, el color amarillo significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las muestras.



**Figura 71:** Cladograma LEfSe que informa las diferencias entre taxones fúngicos. Los círculos desde afuera hacia adentro representan los diferentes niveles de clasificación desde filo a especie. El diámetro de cada círculo es proporcional a la abundancia de cada taxón. El color amarillo representa que no hubo diferencias estadísticamente significativas, es decir no se encontró un marcador con una puntuación mayor a 4 ( $LDA > 4$ ).

Los análisis de ANOVA y Test de Wilcox indicaron que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los filos, clases, órdenes, familia, géneros y especies fúngicas de las muestras de los suelos agrícolas para las campañas 2014-2015 y 2015-2016.

## 5. Discusión

En este trabajo, en primer instancia se evaluó la tolerancia de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 frente al fungicida Options Advance (NOVA) que es utilizado en la actualidad como curasemillas para la siembra de maní. Los resultados demostraron que la presencia del fungicida no inhibe el crecimiento de la cepa ni la viabilidad de los conidios del hongo por un periodo de siete días desde que los mismos son peleteados en las semillas. Esta resistencia a compuestos tóxicos que presentan las cepas de *Trichoderma* ha sido asociada a sistemas de transporte celular tipo ABC (Harman *et al.*, 2004). La posibilidad de realizar un control integrado de las enfermedades utilizando un fungicida sintético en combinación con un agente de control biológico permite desarrollar una mejor estrategia en el control de enfermedades debido a que los efectos de ambos se complementan y potencian. La utilización de una menor dosis de fungicidas químicos disminuye los efectos negativos que estas sustancias ocasionan en la salud y medio ambiente. Además con una baja dosis se reduciría el desarrollo de resistencia al fungicida por parte del patógeno. El control integrado de enfermedades ha sido estudiado en *Trichoderma* desde hace mucho tiempo, como en el caso de la inoculación de *T. harzianum* en combinación con fungicidas químicos en el control de la enfermedad del moho gris de pepino donde se obtuvo una mayor eficiencia comparado con los tratamientos individuales (Elad *et al.*, 1993); además, utilizando un control integrado se logró inhibir completamente la misma enfermedad en frutilla (Barakat y Al-Masri, 2017). Del mismo modo, Mouria *et al.* (2018) demostraron que la combinación de un fungicida y de una cepa de *Trichoderma* presentaba mejores efectos que al aplicar el fungicida solo en la reducción de la enfermedad conocida como la explosión del arroz. También, la aplicación integrada de *T. harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* y Hexaconazole demostró controlar la enfermedad de la pudrición del cuello del garbanzo, mejoró el crecimiento y rendimiento del cultivo en condiciones de campo (Singh *et al.*, 2017). Por lo tanto, en base a los resultados del presente trabajo la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 podría ser aplicada junto con el curasemillas para controlar las enfermedades que causan el problema conocido como “damping off”, el cual consiste en una muerte temprana de los cultivos, ya que las enfermedades se manifiestan en las fases iniciales de la siembra, durante el proceso de germinación de las semillas. Aunque la eficacia de la cepa ITEM 3636, para mitigar este problema, debería ser analizada mediante estudios.

En los ensayos a campo correspondientes a las campañas 2014-2015 y 2016-2017 se observó a los 15 días post siembra una promoción de la germinación de las semillas

peleteadas con *T. harzianum* ITEM 3636 del 25% y 36%, respectivamente. Estos resultados son importantes porque uno de los factores relevantes en la siembra temprana del cultivo es la temperatura subóptima, que sumado a la baja calidad fisiológica de la semilla de maní, dificulta una adecuada germinación y emergencia a campo. Debido a esto para obtener una densidad de plantas óptima comúnmente se siembra hasta un 50% más de la cantidad de semilla recomendada (Kearney *et al.*, 2011). Del mismo modo, se ha reportado que especies de *Trichoderma* fueron capaces de estimular la germinación de semillas de soja y este efecto contribuyó a reducir pérdidas debido a la germinación errática y retardada de las semillas (Mukhtar *et al.*, 2012). También, se observaron efectos significativos sobre la germinación de las semillas y el vigor de plántulas de trigo a partir de semillas inoculadas con esporas de *Trichoderma*, como así también por la aplicación de los metabolitos termosensibles producidos por la cepa (Hajjegrhari y Mohammadi, 2016). Además la combinación de una cepa de *Trichoderma* con fertilizantes estimuló de manera significativa la germinación de maíz, en comparación con el tratamiento con fertilizante únicamente (Okoth *et al.*, 2011). Ha sido descrito que el tratamiento de semillas o la aplicación en el suelo de *Trichoderma* mejora el porcentaje de germinación de las semillas, por acción directa mediante la activación de enzimas y fitohormonas e indirectamente alterando la microbiota y la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Singh *et al.*, 2018). De este modo, la estimulación en la germinación de las semillas inducida por la cepa ITEM 3636 es un efecto importante, ya que podría aumentar la producción de maní y bajar los costos en la siembra del cultivo.

Los efectos de *Trichoderma* sobre la estimulación del crecimiento vegetal han sido reportados en numerosos trabajos (Sección 1.5). Sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo no se ha encontrado aumentos en la promoción de crecimiento a los 75 días post siembra en ensayos a campo e invernadero. Los efectos positivos de *Trichoderma* pueden obtenerse en diferentes especies de plantas. En el maíz, el efecto sobre la promoción del crecimiento de las plantas es específica del genotipo y algunos híbridos responden negativamente a diferentes cepas del hongo (Harman, 2006). Tucci *et al.* (2011) demostraron que el grado de estimulación del crecimiento vegetal depende en gran medida del genotipo de la planta, en su caso del tomate, lo que sugiere que la respuesta de *Trichoderma* spp. está bajo el control genético de la misma. Siguiendo con este estudio, el comportamiento de dos de las cepas de *Trichoderma* más estudiadas y utilizadas a nivel mundial, como son *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* P1 produjeron diferentes efectos de acuerdo a la variedad de tomate, provocando un efecto positivo, negativo o no causando efectos significativos en la estimulación del crecimiento del peso seco, longitud del tallo, peso seco radicular, longitud radicular y desarrollo de raíces

laterales. Además de la regulación hormonal y síntesis de compuestos similares a las hormonas vegetales, los autores sugieren que la capacidad de *Trichoderma* para promover el crecimiento depende del genotipo y el estado fisiológico de la planta, como de las condiciones de siembra (es decir, hidroponía frente al suelo o alto contenido de fertilizantes frente a bajo contenido). Esto podría explicar el resultado de haber observado un mayor valor del peso seco radicular en los ensayos de cámara de crecimiento, atribuyendo este efecto a la condición del suelo en donde crecieron las plantas, el cual podría haber sido un suelo más rico en nutrientes comparado al resto de los ensayos. En ensayos futuros será necesario evaluar la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 como promotor de crecimiento vegetal de diferentes cultivares de maní y con la aplicación de fertilizantes.

El mejor criterio para comprobar la eficacia del tratamiento de un estudio de control biológico en condiciones de campo es evaluar el rendimiento del cultivo a cosecha. Por ello, se procedió a determinar los parámetros de rendimiento del cultivo a cosecha (120 días después de la siembra). El análisis se realizó en tres campañas sucesivas desde la 2014-2015 hasta la 2016-2017, realizando un total de cuatro ensayos a campo. Los resultados obtenidos fueron variables, aunque para todos los ensayos siempre se obtuvo un aumento en el valor promedio de la relación del peso de los granos con respecto al peso de la vaina total, en el número de granos calidad confitería y en la masa de granos obtenida y medida en Kg/ha. Los mejores resultados que se obtuvieron corresponden al campo de la campaña 2016-2017, que coincidentemente fue el campo en donde se presentó la mayor incidencia y severidad del carbón del maní. Este mayor incremento en el rendimiento del maní podría ser resultado de la estimulación en la absorción de nutrientes, la secreción de hormonas y la supresión de la enfermedad producidas por *T. harzianum* ITEM 3636, del mismo modo en que los autores Mathivanan *et al.*, (2005) y Al-Ezerjawi y Kadhim, (2014) reportaron incrementos el rendimiento del cultivo de arroz y trigo, respectivamente. La producción de granos calidad confitería, también varió entre los diferentes ensayos registrándose el mayor número de granos por planta en la campaña 2016-2017, produciéndose un 40% más de granos con respecto al tratamiento control. Este incremento es muy importante a la hora de comercializar los granos, ya que poseen un mejor precio de mercado. En la campaña 2015-2016 se puede observar, en ambos ensayos a campo, que los mejores resultados en los parámetros de rendimiento fueron cuando la cepa ITEM 3636 fue inoculada peleteada en las semillas. Inclusive en el campo ubicado en la zona de Cuatro Vientos en donde no se encontraba el patógeno *T. frezii*. Por lo tanto, la forma de aplicación de la cepa influyó en los resultados obtenidos, y coincide con lo observado por Szczech *et al.* (2017). Los autores evaluaron dos métodos

de aplicación de una cepa de *Trichoderma* TRS25 y los mejores resultados en la estimulación de la germinación, promoción del crecimiento y rendimiento en el cultivo de pepino lo obtuvieron con el recubrimiento de semillas con TRS25 comparado con la aplicación en el suelo a través de un vehículo orgánico. Este vehículo parecía producir un efecto fitotóxico en la germinación de semillas, además de causar una disminución en el rendimiento. El efecto de *T. harzianum* ITEM 3636 sobre el rendimiento fue considerable, por lo cual podría utilizarse como un biofertilizante, inclusive en lotes en donde no se encuentre la enfermedad del carbón del maní.

El efecto de *T. harzianum* en el control biológico de diferentes enfermedades y en distintas plantas ha sido ampliamente demostrado (Montealegre *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Además, fue demostrado que *T. harzianum* ITEM 3636 disminuyó el índice de severidad promedio de la enfermedad conocida como podredumbre parda de la raíz en plantas de maní (causado por *Fusarium solani*), aumentando la frecuencia de plantas saludables y el rendimiento. Esto fue confirmado en diferentes ensayos en campos infestados artificial y naturalmente con el patógeno (Rojo *et al.*, 2007). En este trabajo, la aplicación de *T. harzianum* ITEM 3636 fue eficaz para disminuir los síntomas causados por *T. frezii* durante tres campañas sucesivas en campos ubicados en la zona de General Cabrera, en donde hay una fuerte presencia del patógeno debido a las cercanías de plantas procesadoras de maní. Los mayores efectos en la disminución de la incidencia como severidad de la enfermedad se obtuvieron en la campaña 2016-2017 (reducción del 15% y 34% en la incidencia y severidad, respectivamente), que fue justamente el campo en donde se dieron los mayores índices de la enfermedad, registrándose una incidencia de casi el 50% en el tratamiento control. Este campo corresponde a un criadero de semillas de maní (Criadero “El Carmen”), por lo tanto, las rotaciones en la siembra de maní son menos prolongadas que en el resto de los campos y de este modo la cantidad de teliosporas de *T. frezii* se incrementa rápidamente dentro de los lotes. La reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad en las campañas 2014-2015 y 2015-2016 fue similar y en ambas campañas fue significativa con respecto al tratamiento control. En la campaña 2015-2016, se incorporó la inoculación de la cepa mediante riego en el surco de siembra (inoculación en surco), la cual produjo una reducción significativa en la incidencia y severidad de la enfermedad con respecto a su tratamiento control. Sin embargo, los mejores efectos en el biocontrol fueron logrados con el tratamiento de la cepa ITEM 3636 peleteada en la semilla. Estos resultados son similares a los obtenidos en los estudios realizados por Szczech *et al.* (2017), en donde observaron que la aplicación de *Trichoderma* peleteado en la semilla presentaba mejores resultados en el biocontrol, de una enfermedad en el cultivo de pepino, con respecto al

tratamiento de aplicación de *Trichoderma* en el suelo utilizando un complemento orgánico para su aplicación. Dentro de este estudio es interesante resaltar que los resultados fueron observados en presencia de una incidencia alta de la enfermedad; en cambio, cuando la incidencia fue baja no se observaron variaciones significativas entre los tratamientos (peleteado y aplicado en el suelo) en la disminución de la enfermedad, aunque si observaron diferencias con respecto al control. En el futuro será necesario dilucidar el mecanismo de acción por el cual *T. harzianum* ITEM 3636 logra disminuir los síntomas de la enfermedad en los granos de maní, cuando es aplicado peleteado en la semilla o en el surco de siembra. Posiblemente, el mecanismo de acción sea debido a una estimulación de los mecanismos de defensa e inducción de resistencia sistémica en las plantas. En este sentido, las aplicaciones de *T. atroviride* TRS25 peleteado en las semillas o en el suelo, influyeron en las respuestas bioquímicas sistémicas en las hojas de pepino, ocasionando un aumento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tejido vegetal, una disminución en el nivel de peroxidación lipídica y acumulación de compuestos fenólicos (Szczzech *et al.*, 2017). También, dentro de los carbones, el patógeno causante de la enfermedad conocida como agallas de maíz y denominado *Ustilago maydis* (perteneciente a la misma clase que *Thecaphora frezii*), posee un crecimiento biotrófico y sus haustorios penetran la membrana plasmática del huésped, absorben nutrientes y liberan moléculas efectoras que les permiten crecer de forma invasiva en genotipos particulares. Sin embargo, el patógeno no puede iniciar una relación parasitaria si las células huésped mueren antes de la invasión del patógeno. Por lo tanto, la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), HR (respuesta hipersensible), PCD (muerte celular programada) y SAR (respuesta sistémica adquirida) son las respuestas de defensa más efectivas contra los biotrófos (Syed Ab Rahman *et al.*, 2017). Estas respuestas podrían ser las que induce la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 en el cultivo de maní para disminuir los daños ocasionados por *T. frezii*.

Los estudios realizados en este trabajo son tendientes a brindar alternativas para una agricultura sustentable y esto implica el manejo exitoso de los recursos agrícolas para satisfacer las necesidades humanas mientras se mantiene la calidad ambiental y se conservan los recursos naturales para el futuro. Los microorganismos del suelo contribuyen con una amplia gama de servicios esenciales a la sustentabilidad de todos los ecosistemas, actuando como los principales agentes del ciclo de nutrientes, regulando la dinámica de la materia orgánica, la retención de carbono del suelo y la emisión de gases de efecto invernadero, modificando la estructura física del suelo, mejorando la eficiencia de la adquisición de nutrientes por la vegetación y mejorando la salud de las plantas. Estos procesos no solo son esenciales para el funcionamiento de los



ecosistemas naturales sino que constituyen un recurso importante para la gestión sostenible de los ecosistemas agrícolas y ambientales (Singh *et al.*, 2011). Por lo tanto, antes de la liberación de cepas bacterianas o fúngicas beneficiosas en el medio ambiente, es necesaria una evaluación de sus efectos hacia microorganismos no blancos residentes en el suelo para estimar el impacto que tendrían sobre el funcionamiento del ecosistema agrícola. Los efectos en microorganismos no blancos pueden definirse como los efectos del biofertilizante sobre los organismos distintos a los microbios objetivos (patógenos) o aquellos involucrados en los ciclos biogeoquímicos. La pérdida de especies nativas de la rizósfera no es deseable ya que existe la posibilidad de alterar los procesos microbianos que son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas generales del suelo. Del mismo modo, los efectos inmediatos o los efectos acumulativos a largo plazo causarán preocupación ambiental (Sharma *et al.*, 2012). La composición del microbioma de las plantas puede dar lugar a dos resultados importantes en la producción a campo. Por un lado, plantas saludables, cuando el microbioma es diverso y hay una cooperación metabólica, un intercambio de nutrientes y hormonas entre la planta huésped y el microbioma. Por el otro lado, enfermedad de la planta, cuando el microbioma interactúa con patógenos de manera sinérgica, afectando la salud general de la planta (Berg *et al.*, 2017). La diversidad del microbioma es crucial en la salud de la planta y puede cambiar muy fácilmente, desde promover la salud a promover la enfermedad de la planta (Yan *et al.*, 2017). En una planta saludable, los organismos que son parte de su microbioma influyen en el balance hormonal y de nutrientes, produciendo un incremento en la producción. Los microbios benéficos como, hongos micorrízicos, bacterias nodulantes y microorganismos endófitos son los organismos más influyentes en la estructura del microbioma (Berg *et al.*, 2017).

En este marco, mediante dos técnicas moleculares, se estudió el impacto de la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 sobre las comunidades de bacterias y hongos presentes en los suelos agrícolas donde se llevaron a cabo los ensayos de biocontrol y promoción de crecimiento. Una de las técnicas utilizadas fue la de PCR-DGGE, que es una técnica molecular de huella dactilar o “fingerprinting” que permite la detección de las poblaciones microbianas más abundantes, cultivables y no cultivables (Roesti *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos mediante esta técnica demostraron que la aplicación de la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 no produjo efectos significativos sobre las comunidades bacterianas, fúngicas y de bacterias nitrificantes predominantes del suelo. Además, la aplicación mediante el riego de una suspensión de conidios del hongo en el surco de siembra tampoco generó variaciones en las comunidades bacterianas y fúngicas. También si se comparan las formas de aplicación (peleteo de semillas o

inoculación en surco) del agente de biocontrol no se produjeron diferencias significativas entre los índices de alfa diversidad de ambas. Por lo tanto, la cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 podría ser aplicada de ambas maneras sin producir cambios significativos en las bacterias y hongos más predominantes del suelo. A diferencia de estos resultados, Roesti *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la bioinoculación sobre la estructura de las comunidades bacterianas del suelo rizosférico durante una temporada del cultivo de trigo, en tres campos diferentes (diferían en la aplicación de fertilizantes). Estos autores encontraron que la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias indujo modificaciones en la estructura de las comunidades bacterianas y afirmaron que una parte sustancial de las poblaciones presentes se vio afectada por factores como, el estadio fenológico del cultivo, la aplicación de fertilizantes o el tipo de bioinoculante. Además, informaron que sus resultados presentaban una gran heterogeneidad entre las muestras, inclusive con las tomadas del mismo campo o parcela, contrariamente a los resultados que podrían haber obtenido en condiciones más controladas. En los resultados expuestos en esta Tesis, la principal fuente de variación encontrada entre las comunidades microbianas de las muestras (calculadas a través de dos índices de alfa diversidad diferentes) estuvo en los diferentes tiempos de muestreo; por un lado, las muestras tomadas a los 75 días post siembra (el cultivo de maní se encuentra en estadio R2-R3: formación del ginóforo), y por el otro lado, las muestras tomadas a los 120 días post siembra (las plantas se encontraban arrancadas sobre el suelo del lote secándose). Las variaciones observadas entre los diferentes tiempos de muestreo pueden deberse a numerosos factores, tales como, condiciones climáticas, manejos agronómicos, el estadio del cultivo, la fauna autóctona, las características del suelo y factores antropogénicos, todos estos elementos actúan en conjunto y obligan a las comunidades del suelo a responder constantemente (Hagn *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2003; Postma *et al.*, 2008). Con respecto a las propiedades edáficas, debido a que afectan fuertemente a la estructura y función de las comunidades microbianas (Kaiser *et al.*, 2016) se determinaron tres parámetros fisicoquímicos de los suelos agrícolas y se observó una gran homogeneidad entre el contenido de materia orgánica, ph y contenido de nitrógeno en los lotes para los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo. En especial en las muestras tomadas a los 75 y 120 días post siembra, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de los tres parámetros medidos. Por lo tanto, en este estudio las condiciones edáficas no parecen contribuir fuertemente en la diversidad microbiana encontrada en los suelos de los campos.

La otra metodología empleada para el estudio de las comunidades microbianas fue la secuenciación masiva de amplicones. Mediante esta técnica se obtuvo una mayor profundidad en el estudio, comparada a la técnica de PCR-DGGE, y se llegaron a determinar una gran cantidad de taxones. Estos se agruparon para formar, en promedio, 25 filos y 220 géneros bacterianos diferentes. Dentro de los hongos se encontraron, en promedio entre todas las muestras, 7 filos y una cantidad variable de géneros fúngicos (de 62 a 117). Además, al analizar las curvas de rarefacción bacterianas y fúngicas, obtenidas para todas las muestras, se puede observar que la cantidad de OTUs obtenidas fueron lo suficientemente grandes para representar las comunidades microbianas del suelo.

En una caracterización molecular de las comunidades bacterianas realizada por Haldar *et al.* (2011) en el suelo de un campo destinado a la producción de maní mediante la tipificación molecular basada en el gen del ARNr 16S, los autores encontraron que los dos filos más importantes fueron *Proteobacteria* (41%) y *Bacteroidetes* (24%), además, solo detectaron los géneros *Agrobacterium* y *Bacillus*. Del mismo modo, en el presente estudio, el filo con mayor abundancia relativa encontrado en todas las muestras fue el de *Proteobacteria* (en promedio 35%) y los *Bacteroidetes* se encontraron entre los 10 filos más abundantes con un valor promedio, entre todas las muestras, de 3%. Este es un valor muy inferior al encontrado por los autores, aunque posiblemente puede ser debido a las diferencias en las profundidades de los estudios realizados, en donde las diferencias en las cantidades de filos totales presentes en las muestras influye en forma directa sobre las abundancias relativas.

En el presente estudio, se observaron para las muestras de la campaña 2014-2015 un aumento significativo en las abundancias relativas de los filos bacterianos *Spirochaetae* y *Chloroflexi* en el tratamiento peleteado con respecto al tratamiento control. Los miembros del filo *Spirochaetae* se han asociado con una degradación efectiva de la ciprofloxacina, uno de los antibióticos más utilizados y detectados con mayor frecuencia en los suelos agrícolas (Huang *et al.* 2017). El filo *Chloroflexi* es muy ramificado y diverso, ya que se han aislado microorganismos de este grupo que son termófilos aerobios y anaerobios, fotótrofos anoxigénicos filamentosos y respiradores anaerobios organohalogenados, pudiendo utilizar en su respiración una amplia gama de productos químicos halogenados o sustancias organohalogenadas naturales que podrían funcionar como posibles aceptadores de electrones. De este modo, los microorganismos pertenecientes a este filo pueden desempeñar un papel integral en el ciclo biogeoquímico del cloro (Krzmarzick *et al.*, 2011). Para las muestras obtenidas de la campaña 2015/2016, el filo *Ignavibacteriae*

presentó una mayor abundancia en las muestras obtenidas del tratamiento peleteado con respecto al control. Este filo fue descubierto recientemente y se piensa que *Chlorobi* e *Ignavibacteriae* se originaron como un grupo integrado de un ancestro en común con los *Bacteroidetes*. Además, los miembros de este filo son quimioorganoheterótrofos y utilizan varios hidratos de carbono como fuente de carbono y energía, entre los que se destaca la celulosa; por este motivo se piensa que este grupo de microorganismos está involucrado en la descomposición de la materia orgánica (Podosokorskaya *et al.*, 2013). Al analizar los efectos sobre la diversidad producida por la inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 en este nivel de clasificación, dos de los tres filios estaban dentro de la clasificación de “Otros” por lo tanto poseen una abundancia relativa baja y posiblemente pequeños cambios en sus abundancias ocasionen diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias encontradas posiblemente sean debidas a una variabilidad intrínseca del campo, ya que ninguno de los filios presentó una variación en las dos campañas consecutivas, y además solo se encontró diferencias en tres de los veinticinco filios obtenidos. En ambas campañas el segundo filo más abundante fue el de las *Actinobacterias*, las cuales no presentaron variaciones significativas en sus abundancias relativas entre ninguna de las muestras de ambas campañas. Este filo es importante porque es típico de sustratos supresores, ya que sus miembros tienen el potencial de actuar como agentes de control biológico (Cuesta *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta las variaciones encontradas a nivel de género se podrían representar los demás niveles superiores de clasificación taxonómica, debido a que en cada uno de ellos se engloban los diferentes géneros encontrados. El nivel de asignación de las diferentes OTUs en sus respectivas especies podría ser muy arriesgado debido a que en la actualidad se está volviendo cada vez más complejo determinar especies de microorganismos. Por este motivo si analizamos algunos de los géneros más estudiados tales como, *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Acinetobacter*, *Rhizobium* y *Burkholderia*, para generar un criterio de comparación, se puede observar que solo el género *Acinetobacter* varió entre el tratamiento control y el tratamiento peleteado para la campaña 2014-2015, observándose una mayor abundancia en el tratamiento peleteado. Algunas especies de este género son consideradas como PGPR porque fijan nitrógeno, solubilizan fosfato, producen sideróforos e IAA (Çakmakçı *et al.*, 2017). Esta variación en las abundancias encontradas puede ser debido a que este género se encontraba en muy baja proporción en esa campaña, por lo tanto pequeñas variaciones pueden ocasionar diferencias significativas. Es importante resaltar que el total de los géneros que presentaron variaciones, en ambas campañas, se encuentran dentro de “Otros”, en donde se encuentran todos aquellos géneros con bajas abundancias relativas. Sin

embargo, es interesante analizar el caso de *Clostridium\_sensu\_stricto\_10*, el cual presentó una abundancia significativamente mayor para el tratamiento peleteado con respecto al tratamiento control en ambas campañas. Está es una tendencia que permite especular que posiblemente la cepa de *Trichoderma* tenga algún efecto sobre este género. En los mapas de calor, se pueden observar ciertos patrones con similitudes entre las muestras. También, al igual que para el ensayo de PCR-DGGE, las mayores variaciones se dieron entre los diferentes tiempos de muestreo y, por lo general, no se observó una diferencia considerable entre los tratamientos.

Por otro lado, dentro del estudio del impacto sobre las comunidades fúngicas, fueron los *Ascomycota* y *Zygomycota* los filos de hongos más abundantes en todas las muestras del estudio, seguidos de *Basidiomycota*, *Chitridiomycota*, *Glomeromycota* y *Rozellomycota*. Para el filo *Cercozoa* (Reino *Rhizaria*) se obtuvo un alto número de secuencias detectadas en este estudio. Sin embargo, es común que las bases de datos de hongos incluyan secuencias no fúngicas con el fin de proporcionar referencias que permitan la diferenciación entre secuencias fúngicas y no fúngicas, al menos a nivel de filo (Detheridge *et al.*, 2016). En este nivel de clasificación, solo se observó variación estadísticamente significativa en la abundancia relativa de los *Glomeromycota* entre el tratamiento peleteado y el control. Debido a la importancia de este filo hay que decir que la mayor abundancia estuvo en las muestras del tratamiento de inoculación con la cepa ITEM 3636. Los hongos micorrízicos arbusculares (AMF, filo *Glomeromycota*) se encuentran entre los microorganismos del suelo con la mayor influencia positiva sobre la nutrición de las plantas, ya que establecen interdependencia con sus huéspedes. Estos hongos colonizan la corteza de la raíz de la planta y expanden sus hifas hacia el suelo circundante donde buscan nutrientes de baja movilidad como el fósforo y lo trasladan hacia las plantas (Goetten *et al.*, 2016). Posiblemente, la variación encontrada en este estudio sea propia del lote y no por el efecto del *Trichoderma*, debido a que una de las réplicas del tratamiento control presentó un valor muy bajo en la abundancia de este filo.

Siguiendo el mismo criterio utilizado para bacterias, si analizamos algunos de los géneros fúngicos más estudiados del suelo tales como, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Glomus* y *Trichoderma*, solo se observó la variación del género *Trichoderma* entre el tratamiento control y peleteado en la campaña 2015-2016. Esto también fue observado en un estudio realizado por Zhang *et al.* (2018), en donde la biofertilización de pastizales con *Trichoderma* (utilizando 9000 kg ha<sup>1</sup>, una cantidad mucho mayor a la utilizada en el presente trabajo) incrementaba las abundancias relativas de *Archaeorhizomyces* y *Trichoderma* mientras disminuía la de *Ophiosphaerella*. Las

observaciones en la presente Tesis, se complementan con el estudio realizado por Friedl y Druzhinina (2012), en donde observaron que las OTUs correspondientes a *Trichoderma* solo se encontraban en proporciones menores en comparación con otros grupos dominantes dentro de los *Ascomycota*; además, los autores concluyeron que muchas especies de *Trichoderma* que habitan en el mismo nicho microecológico no solo compiten entre sí, sino que también pueden actuar de forma sinérgica, acelerando la detección de factores abióticos y facilitando así su distribución mutua. Igualmente, este género también se vio modificado entre cada uno de los tratamientos con respecto a la condición inicial, esto representaría una gran variabilidad de este género entre las muestras. Al no observarse este comportamiento en la campaña anterior (2014-2015), posiblemente esta variación sea propia de las distribuciones de estos microorganismos en el lote y no por acción de la aplicación. Además, en la campaña 2014-2015 disminuyó la abundancia del género *Colletotrichum* y *Purpureocillium* en el tratamiento peleteado con respecto al control. El género *Colletotrichum* cuenta con algunas especies fitopatógenas de muchos cultivos (De Silva *et al.*, 2017), mientras que algunas especies del género *Purpureocillium* son utilizadas como agentes de biocontrol frente a patógenos fúngicos (Lan *et al.*, 2017) y nemátodos (Kepenekci *et al.*, 2018). Sin embargo, este resultado solo se observó en esa única campaña. En general, los géneros que presentaron variaciones entre los tratamientos y la condición inicial fueron aquellos que tienen una baja abundancia relativa (Dentro de "Otros"). Asimismo, en las comunidades fúngicas se observó una gran variabilidad entre las muestras, esto concuerda con los resultados de los mapas de calor en los cuales no se encontraron perfiles similares entre las muestras e inclusive con su réplica. Aunque, en general, las muestras se separaron de acuerdo al año de la campaña y posteriormente por la fecha de muestreo en los diferentes mapas de calor.

El estudio de la secuenciación de amplicones basado en NGS es una herramienta que permite determinar, con bastante precisión, si hay alteraciones en las comunidades microbianas. La cepa de *T. harzianum* ITEM 3636 no modificó significativamente las poblaciones de hongos y bacterias en los niveles de filo y género, como se ha mostrado a lo largo del análisis. Esto se complementa con los análisis de alfa y beta diversidad obtenidos en este estudio, los cuales presentaron similitudes con los resultados obtenidos por PCR-DGGE. Es decir, que el efecto que introdujo la mayor perturbación de las poblaciones analizadas no se debió a la aplicación del agente de biocontrol sino a otra serie de factores detallados anteriormente. En un estudio similar, Cordier y Alabouvette (2009) realizaron un experimento para estudiar el impacto en las comunidades de hongos y bacterias de dos suelos causado por la inoculación de la cepa de *T. atroviride* I-1237, que había presentado la capacidad de controlar patógenos del suelo. Los autores

observaron que la introducción de la cepa I-1237 en el suelo prácticamente no afectó a las comunidades bacterianas, y el efecto del biocontrolador desapareció rápidamente, mostrando que luego de 3 meses los suelos de ambos tratamientos eran similares. En cambio, la estructura de las comunidades fúngicas fueron significativamente afectadas en un lapso de 3 meses; luego las diferencias se volvieron menos evidentes y desaparecieron para el final del ensayo, a los 9 meses post inoculación. Del mismo modo, Savazzini *et al.* (2009) observaron que la aplicación de una cepa de *Trichoderma* producía efectos significativos sobre las comunidades bacterianas y fúngicas durante las dos primeras semanas. Al pasar el tiempo, las condiciones ambientales, la profundidad del suelo y manejos agronómicos fueron los que produjeron las mayores variaciones en las comunidades. Además, los autores concluyen que la aplicación de *Trichoderma* presenta un bajo riesgo para las bacterianas y hongos no blancos del suelo.

La línea de investigación que se viene desarrollando en nuestro equipo de trabajo está dirigida al estudio de microorganismos como potenciales biofertilizantes y/o biopesticidas con la convicción que representan una avanzada herramienta biotecnológica que aumenta la productividad, mejora la calidad y son responsables del desarrollo de una agricultura sustentable, no contaminante. En este trabajo se intentó brindar un complemento para abordar una enfermedad muy difícil de manejar, por su alta diseminación y poder de devastación de los granos. Por este motivo, necesita ser abordada desde diferentes enfoques, tales como, el monitoreo de los lotes, uso de variedades resistentes (Bressano *et al.*, 2019), rotaciones prolongadas para la siembra de maní y utilización de fungicidas químicos.

## 6. Conclusión

La aplicación a campo de la cepa de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 ejerció efectos benéficos en el cultivo de maní, causando estimulación de la germinación de las semillas y la obtención de mayores rendimientos a cosecha con una mayor número de granos de calidad confitería. Además, demostró capacidad para disminuir los síntomas de la enfermedad del carbón del maní causado por *Thecaphora frezzi*, sin que su aplicación produzca un impacto significativo en las comunidades microbianas del suelo. Por lo tanto, esta cepa podría ser utilizada como una herramienta de control biológico del carbón del maní, como así también biofertilizante del cultivo, en el marco de una agricultura sustentable y no contaminante.



## 7. Bibliografía

- Albrecht T., Argueso C.T., (2016). Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Annals of Botany* 119, 725–735.
- Al-Ezerjawi N.H and Kadhim J.H. (2014). Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on total nitrogen, chlorophyll a & b contents and yield of wheat (*Triticum aestivum* L) Class Eba'a-95. *Int J Sci Res*, 3(8), pp.1078-1083.
- Alonso-Ramirez A., Poveda J., Martin I., Hermosa R., Monte E., Nicolas C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol. Plant Pathol.* 15, 823e831.
- Anderson I.C., Campbell C.D., Prosser J.I. (2003a). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol* 5:36–47.
- Anderson I.C., Campbell C.D., Prosser J.I. (2003b). Diversity of fungi in organic soils under a moorland: scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environ Microbiol* 5:1121–1132.
- Andrés J.A., Correa N.S., Rosas S.B. (1998) Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram. Isolation of fungicide resistant strains. *Biol Fertil Soils* 26:141-145.
- Andrés J.A., Correa N.S., Rosas S.B. (1999) El potencial mutagénico del fungicida thiram. *Rev Arg Microbiol* 31:82-86.
- Andrés J.A., Pastor N.A., Ganuza M., Rovera M., Reynoso M.M., Torres A. (2016) Biopesticides: An Eco-Friendly Approach for the Control of Soilborne Pathogens in Peanut. In: Singh D, Singh H, Prabha R (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi, pp. 161-179.
- Astiz Gassó M. y Marinelli A. (2013). Biología de la germinación de *Thecaphora frezii* in vitro. 28º Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba. pp 62-63.
- Astiz Gassó M.M., Leis R., Marinelli A.D. (2008). Evaluación de incidencia y severidad del carbón del maní (*Thecaphora frezii*) en infecciones artificiales sobre cultivares comerciales de maní.
- Azarmi R., Hajieghrari B., Giglou A. (2011). Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 5850–5855.

- Bae H., Roberts D.P., Lim H.S., Strem M.D., Park, S.C., Ryu C.M., Melnick R.L., Bailey B.A. (2010). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *MPMI* 24, 336–351.
- Bae H., Sicher R.C., Kim M.S., Kim S.H., Strem M. D., Melnick R.L. & Bailey B.A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot* 60, 3279–3295.
- Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55:541-555.
- Baker R., Elad Y. and Chet I. (1984). The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology* 74, 1019–1021.
- Barakat R.M., Al-Masri M.I. (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* in Combination with Fungicides in Controlling Gray Mould Disease (*Botrytis cinerea*) of Strawberry. *American Journal of Plant Sciences* 8: 651-665.
- Benítez T., Rincón A.M., Carmen Limón M., Codón A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260.
- Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17:478–86.
- Berg G., Köberl M., Rybakova D., Müller H., Grosch R. and Smalla K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS microbiology ecology*, 93(5).
- Bianco C. A., Kraus T. A. y Nuñez C. O. (2006). Botánica Agrícola, 2da ed.- Córdoba: Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN 978-950-665-400-9.
- Bishi S.K., Kumar L., Mahatma M.K., Khatediya N., Chauhan S.M., Misra J.B. (2015). Quality traits of Indian peanut cultivars and their utility as nutritional and functional food. *Food Chem* 167:107–114.
- Blum W.E.H., (2006). Functions of soil for society and the environment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4:75–79.
- Boller T., Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern- recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406.
- Bolsa de Cereales de Córdoba. <http://www.bccbba.com.ar/mani-7165.html>.
- Boote, K. J. (1982). Growth stage of peanut. *Peanut Sci.* 9: 35-40.

- Bouma J., (2001). The new role of soil science in a network society. *Soil Sci.* 166:874–879.
- Brader G., Compant S., Vescio K., Mitter B., Trognitz F., Ma L. J., Sessitsch A. (2017). Ecology and genomic insights on plant pathogenic and nonpathogenic endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), pp. 61-83.
- Bressano M., Massa A.N., Arias R.S., de Blas F., Oddino C., Faustini P.C., et al. (2019) Introgression of peanut smut resistance from landraces to elite peanut cultivars (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS ONE* 14(2): e0211920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211920>
- Brotman Y., Briff E., Viterbo A. & Chet I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147, 779–789.
- Cai F., Yu G., Wang P., Wei Z., Fu L., Shen Q., & Chen W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant physiology and biochemistry*, 73, 106-113.
- Çakmakçı R., Turan M., Kıtır N., Güneş A., Nikerel E., Özdemir B.S., Yıldırım E., Olgun M., Topçuoğlu B., Tüfenkçi Ş. and Karaman M.R. (2017). The role of soil beneficial bacteria in wheat production: a review. In *Wheat Improvement, Management and Utilization*. IntechOpen.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5): 335-336.
- Carbone I., Kohn L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91:553–556.
- Carranza J., Lindquist J. (1962). *Thecaphora frezii*, parasita de *Arachis* sp. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 10:11-18
- Carsolio C., Gutiérrez A., Jiménez B., Van Montagu M., Herrera-Estrella A., (1994). Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10903-10907.
- Catalano V., Vergara M., Hauzenberger J.R., Seiboth B., Sarrocco S., Vannacci G., Kubicek C.P., Seidl-Seiboth V. (2011). Use of a nonhomologous end-joining-deficient strain (delta-ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene lcc1 in sclerotia degradation. *Curr Genet* 57: 13–23.
- Cazón L.I., Paredes J.A., Bisonard E.M., Rago A.M. (2016). Capacidad de infección de *Thecaphora frezii* en el tiempo. 31° Jornada Nacional de Maní. 22 de septiembre. General Cabrera, Córdoba. 52 p.

- Chang Y.C., Baker R., Kleifeld O. and Chet I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 70, 145–148.
- Chao A., Chazdon R.L., Colwell R.K., and Shen T.J. (2006). Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics* 62, 361–371.
- Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W.M., et al. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3): 558–590.
- Chen L.L., Yang X., Raza W., Li J., Liu Y., Qiu M., Zhang F. & Shen Q. (2011). *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 1653–1663.
- Chet I., Inbar J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 48:37-43.
- Chet I., Inbar J., Hadar I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds), *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184.
- Cholaky, L. (1996). Etapas de desarrollo del maní (*Arachis hypogaea* L.). Dpto. Prod. Vegetal. FAV-UNRC. Mimeo. 6 p.
- Clarke K.G., Gorley R.N. (2006). PRIMER v6: User Manual/Tutorial. Plymouth: PRIMER-E.
- Cole J.R., Chai B., Farris R.J., et al. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* ;35 (Database issue): D169–72.
- Conforto C., Cazón I., Fernández F.D., Marinelli A., Oddino C., Rago A.M. (2013). Molecular sequence data of *Thecaphora frezii* affecting peanut crops in Argentina. *Eur J Plant Pathol* 137:663–666.
- Conrath U., (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci* 16:524-531.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C. & López-Bucio J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149, 1579–1592.
- Cordier C. and Alabouvette C. (2009) Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non-target soil micro-organisms. *Eur J Soil Biol*

- 45, 267–274.
- Cuesta G., Garcia de la Fuente R., Abad M. and Fornes F. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *J Environ Manage* 95, S280–S284.
  - D’Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311:374–377.
  - De Silva D.D., Crous P.W., Ades P.K., Hyde K.D. and Taylor P.W. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), pp.155-168.
  - DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 72(7):5069–72.
  - Detheridge A.P., Brand G., Fychan R., Crotty F.V., Sanderson R., Griffith G.W. and Marley C.L. (2016) The legacy effect of cover crops on soil fungal populations in a cereal rotation. *Agr Ecosyst Environ* 228, 49–61.
  - Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
  - Dix N.J. and Webster J. (1995). *Fungal Ecology*, Chapman & Hall, London. ISBN 0-412-22960-9.
  - Djonović S., Pozo M.J., Kenerley C.M. (2006a). Tv-bgn3, a beta-1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens* is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7661–7670.
  - Djonović S., Vittone G., Mendoza-Herrera A., Kenerley C.M. (2007). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing beta-1,3- and beta-1,6-glucanase genes. *Mol Plant Pathol* 8:469–480.
  - Djonović, S., Pozo, M.J., Dangott, L.J., Howell, C.R. and Kenerley, C.M. (2006b). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 19, 838–853.
  - Dodds P.N., Rathjen J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539-548.
  - Donoso E.P., Bustamante R.O., Caru M. & Niemeyer H. M. (2008). Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl Environ Microbiol* 74, 1412–1417.

- Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. (2011). *Trichoderma*—the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9:749–759.
- Edgar R.C., (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 26(19): 2460-2461.
- Elad Y., Zimand G., Zaqs Y., Zuriel S., Chet I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology* 42, 324–332.
- Escalante A., (2007). La ecología molecular en el estudio de las comunidades bacterianas. In: Eguiarte L.E., Souza V., Aguirre X. (Eds.), *Ecología Molecular*. pp. 393–425.
- Escobar-Zepeda A., Vera-Ponce de León A., Sanchez-Flores A. (2015). The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Front. Genet.*, 6, 348.
- Fernandez E. y Giayetto O. (2006). El cultivo de maní en Córdoba. Universidad Nacional de Río Cuarto. 280pp.
- Fernandez, E. M. y Giayetto, O. (2017). El cultivo de maní en Córdoba, Segunda Edición ampliada. – Las Higueras, Córdoba (Argentina). ISBN 978-987-42-3736-1
- Francisco M.L.D.L. and Resurrección A.V.A. (2008). Functional components in peanuts. *Crit Rev Food Sci Nut* 48:715–746.
- Friedl M.A. and Druzhinina I.S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, 158(Pt 1), p.69.
- Gaderer R., Lamdan N.L., Frischmann A., Sulyok M., Krska R., Horwitz B.A., Seidl-Seiboth V. (2015). Sm2, a paralog of the *Trichoderma* ceratoplatanin elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. *BMC Microbiol* 15:2. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-014-0333-0>.
- Garbeva P., Van Veen J.A., Van Elsas J.D. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42: 243–270
- Gardes M., Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for *basidiomycetes*-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118.

- Garnica-Vergara A., Barrera-Ortiz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ruiz-Herrera L.F. and López-Bucio J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209, 1496–1512.
- Gelsomino A., Keijzer-Wolters A.C., Cacco G., van Elsas J.D., (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 38, 1 – 15.
- Geremia R.A., Goldman G.H., Jacobs D., Ardtes W., Vila S.B., Van Montagu M. and Herrera-Estrella A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular microbiology*, 8(3), pp.603-613.
- Godfray H.J. and Lawton J.H. (2001). Scale and species numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 400-404.
- Goetten L.C., Moretto G. and Sturmer S.L. (2016) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced onfarm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. *Acta Bot Bras* 30, 9–16.
- Gomes N.C.M., Fagbola O., Costa R., Rumjanek N.G., Buchner A., Mendona-Hagler L., Smalla K. (2003). Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3758–3766.
- Gravel V., Antoun V. & Tweddell R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indoleacetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem* 39, 1968–1977.
- Green J.L., Holmes A.J., Westoby M., Oliver L., Briscoe D., Dangerfield M., Gillings M. and Beattie A.J. (2004). Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature.* 432: 747-750.
- Grifoni A., Bazzicalupo M., Di Serio C., Fancelli S., Fani R. (1995). Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiology Letters* 127, 85–91.
- Guzmán-Guzmán P., Porrás-Troncoso M.D., Olmedo-Monfil V., Herrera-Estrella A. (2018). *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology* PHYTO-07-18-0218-RVW. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>.
- Hagn A., Pritsch K., Schloter M., Munch J.C. (2003). Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to

- biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biology and Fertility of Soils* 38, 236–244.
- Hajieghrari B. and Mohammadi M. (2016). Growth-promoting activity of indigenous *Trichoderma* isolates on wheat seed germination, seedling growth and yield. *Australian Journal of Crop Science*, 10(9), p.1339.
  - Haldar S., Roy Choudhury S. and Sengupta S. (2011) Genetic and functional diversities of bacterial communities in the rhizosphere of *Arachis hypogaea*. *Antonie van Leeuw* 100, 161–170.
  - Hammer O., Harper D.A.T. and Ryan P.D. (2001). PAST Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electronica* 4(1): 9 pp.
  - Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., and Goodman R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5:245–249.
  - Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 79(3):293-320.
  - Harman G.E., (2000). Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 84, 377–393.
  - Harman G.E., (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190–194.
  - Harman G.E., Herrera-Estrella A.H., Horwitz B.A., Lorito M. (2012). Special issue: *Trichoderma* – from Basic Biology to Biotechnology. *Microbiology* 158, 1–2. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056424-0>
  - Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43-56.
  - Hermosa R., Rubio M.B., Cardoza R.E., Nicolás C., Monte E., Gutiérrez S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY* 16:69-80.
  - Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158:17–25.
  - Howell C.R., (1998). The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman G.E., Kubicek C.P. (eds), *Trichoderma & Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis, Padstow, pp 173-184.



- Howell C.R., (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87:4-10.
- Huang X.P., Mo C.H., Yu J., Zhao H.M., Meng C., Li Y.W., Li H., Cai Q.Y. et al. (2017) Variations in microbial community and ciprofloxacin removal in rhizospheric soils between two cultivars of *Brassica parachinensis* L. *Sci Total Environ* 603–604, 66–76.
- Huson D.H., Auch A.F., Qi J., Schuster S.C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.* 17(3):377–86.
- Inch S., Gilbert J. (2011). Scanning electron microscopy observations of the interaction between *Trichoderma harzianum* and perithecia of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 103:1–9.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kaiser K., Wemheuer B., Korolkow V., Wemheuer F., Nacke H., Schöning I., Schrupf M., Daniel R. (2016). Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Scientific Reports* 6, 33696.
- Kearney M., Cerioni G.A., Stefani R., Morla F.D., Giayetto O., Rosso M.B. y Della Mea J. (2011). Bioestimulante aplicado a la semilla de maní sobre la emergencia, el rendimiento y la calidad. Trabajo presentado en la "XXVI Jornada Nacional de Maní" en General Cabrera - Córdoba - Argentina.
- Kepenekci I., Hazir S., Oksal E. and Lewis E.E. (2018). Application methods of *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii* and *Purpureocillium lilacinum* to control root-knot nematodes in greenhouse tomato systems. *Crop Protection*, 108, pp.31-38.
- Kharwar R., Verma V.C., Kumar A., Redman R. (2009). Endophytic fungi: better players of biodiversity, stress tolerance, host protection and antimicrobial production, in: Chauhan A.K., Varma A. (Eds.), *A Textbook of Molecular Biotechnology*. New Delhi, India, pp. 1033–1357.
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomoms J.N., Lee H. and Trevors T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188.
- Kjeldahl J., (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift Für Analytische Chemie* 22, 366–382.

- Kõljalg U., Nilsson R.H., Abarenkov K., *et al.* (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol.* 22(21):5271–7.
- Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2567–2572.
- Kowalchuk G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M. and Woldendorp J.W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1489-1497.
- Krapovickas A. and Gregory W. C. (1994). Taxonomía del género *Arachis* (*Leguminosae*). *Bomplandia* 8: 1-186.
- Krzmarzick M.J., Crary B.B., Harding J.J., Oyerinde O.O., Leri A.C., Myneni S.C. and Novak P.J. (2012). Natural niche for organohalide-respiring *Chloroflexi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(2), pp.393-401.
- Kubicek C.P., Herrera-Estrella A., Seidl-Seiboth V., Martinez D.A., Druzhinina I.S., *et al.* (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* 12, R40.
- Lan X., Zhang J., Zong Z., Ma Q. and Wang Y. (2017). Evaluation of the Biocontrol Potential of *Purpureocillium lilacinum* QLP12 against *Verticillium dahliae* in Eggplant. *BioMed research international*, 2017.
- Landa B.B., Navas-Cortes J.A., Jimenez-Diaz R.M. (2004). Influence temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *Fusarium* wilt of chickpea. *Plant Pathology* 53: 341-352.
- Latz M.A., Jensen B., Collinge D.B. and Jørgensen H.J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, pp.1-13.
- Leslie J., Summerell B., (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing: Iowa (USA).
- Liu B., Jia G., Chen J. and Wang G. (2006). A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils. Soil Science Society of China. *Pedosphere* 16(1): 18-24.
- Liu J., Yu Y., Cai Z., Bartlam M. & Wang Y. (2015). Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1387-1395.
- López-Bucio J., Pelagio-Flores R. & Herrera-Estrella A. (2015). *Trichoderma* as

- biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia horticultrae* 196, 109-123.
- Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B., Kubicek C.P. (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 178, 6382–6385.
  - Lozupone C. and Knight R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
  - Lynch J.M., Benedetti A.H., Insam H., Nuti M.P., Smalla K., Torsvik V. and Nannipieri P. (2004). Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility Soils* 40: 363-385.
  - Maidak B.L., Olsen G.J., Larsen N., Overbeek R., McCaughey M.J., Woese C.R. (1996). The ribosomal database project (RDP). *Nucleic Acids Res.* 24(1):82–5.
  - Manganiello G., Sacco A., Ercolano M.R., Vinale F., Lanzuise S., Pascale A., Napolitano M., Lombardi N., Lorito M., Woo S.L. (2018). Modulation of Tomato Response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and Its Secondary Metabolite Harzianic Acid. *Frontiers in Microbiology* 9, 1966.
  - Marinelli A., March G., Oddino C., Garcia J., Rago A., Zuza M. (2010). El carbón del maní de 1995 a 2010 de enfermedad emergente a enfermedad endémica y epidémica. 25° Jornada Nacional del Maní. General Cabrera, Córdoba. pp. 28-30.
  - Marinelli A., March G., Rago A. (1995). El carbón del maní *Thecaphora frezii* sobre *Arachis hypogaea* L. Página 134 en 7º Congreso de Micología y 17º Jornadas Argentinas de Micología. Rosario, Santa Fe, Argentina.
  - Marinelli A., March G.J y Oddino C. (2008). Aspectos biológicos y epidemiológicos del carbón del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist. *Agriscientia* Vol. 25: 1.5.
  - Marinelli A., March G.J. y Oddino C. (2008). Aspectos biológicos y epidemiológicos del carbón del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist. *Agriscientia* Vol. 25: 1.5.
  - Marinelli, A. D. y March G.J. (2005). El carbón del maní. En: March G.J. y Marinelli A.D. (eds.), *Enfermedades del maní en la Argentina*. Biglia Impresores. pp 88-89.
  - Marraro Acuña F., (2014). Carbón del Maní (*Thecaphora frezii*). Artículo de divulgación. E.E.A. Manfredi, INTA. URL <https://inta.gob.ar/documentos/carbon-del-mani-thecaphora-frezii>
  - Marraro Acuña F., Cosa M., Wiemer A. (2013). Carbón del maní: Histología,

- incidencia y severidad. 28° Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba. pp. 26-27
- Martínez C., Blanc F., Le Claire E., Besnard O., Nicole M. & Baccou J. C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heatdenatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol* 127, 334–344.
  - Mastouri F., Björkman T. & Harman G.E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100, 1213–1221.
  - Masunaka A., Hyakumachi M. & Takenaka S. (2011). Plant growthpromoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ* 26, 128–134.
  - Mathivanan N., Prabavathy V.R., Vijayanandraj V.R. (2005). Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. *Journal of Phytopathology* 153, 697–701.
  - Medeiros H.A., Araujo Filho J.V., Freitas L.G., Castillo P., Rubio M.B., Hermosa R., Monte E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Sci. Rep.* 7, 40216.
  - Mehta C.M., Palni U., Franke-Whittle I.H., Sharma A.K. (2014). Compost: its role, mechanism and impact on reducing soilborne plant diseases. *Waste Manag* 34:607–622.
  - Mendoza-Mendoza A., Zaid R., Lawry R., Hermosa R., Monte E., Horwitz B.A., Mukherjee P.K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews* 32, 62–85.
  - Molina V., Ulloa O., Farías L., Urrutia H., Ramírez S., Junier P. and Witzel K.P. (2007). Ammonia-Oxidizing  $\beta$ -*Proteobacteria* from the oxygen minimum zone off Northern Chile. *Applied Environmental Microbiology* 73 (11): 3547-3555.
  - Monte E., (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* 4:1-4.
  - Montealegre J., Valderrama L., Sánchez S., Herrera R., Besoain X. & Pérez L. M. (2010). Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13, 1–11.

- Morán-Diez E., Hermosa R., Ambrosino P., Cardoza R. E., Gutiérrez S., Lorito M. & Monte E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 1021–1031.
- Mouria A., Mouria B., Hmouni A., Touhami A.O. and Douira A. (2018). Integrated Control against Rice Blast and Leaf Spot by *Trichoderma harzianum* and Two Fungicides. *Annual Research & Review in Biology*, pp.1-6.
- Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Herrera-Estrella A., Schmoll M. and Kenerley, C.M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual review of phytopathology*, 51, pp.105-129.
- Mukherjee P.K., Kenerley C.M. (2010). Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vel1. *Appl Environ Microbiol* 76:2345–2352.
- Mukherjee P.K., Mukhopadhyay A., Sarmah D., Shrestha S. (1995). Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*: its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol. *J. Phytopathol.* 143:275–79
- Mukhtar I., Hannan A., Atiq M. and Nawaz A. (2012). Impact of *Trichoderma* species on seed germination in soybean. *Pak. J. Phytopathol*, 24(2), pp.159-162.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., Vorholt, J. A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annu. Rev. Genet.* 50, 211–234.
- Mur L.A., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59, 501e520.
- Muyzer G., (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol* 2, 317 – 322.
- Muyzer, G., de Waal E.C., Uitterlinden 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.
- Myers R.M., Maniatis T. and Lerman L.S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527.
- Nacke H., Thürmer A., Wollherr A., Will C., Hodac L., Herold N., et. al. (2011) Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along

- Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS ONE* 6(2): e17000.
- Needelman B.A., (2013). What Are Soils?. *Nature Education Knowledge* 4(3): p. 2.
  - O'Donnell K. L., (1993). Fusarium and its near relatives. In Reynolds D.R. & Taylor J.W. (Eds.), *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford: CAB International. pp. 225–233.
  - Oddino C., Marinelli A., March G., García J., Tarditi L., D'Eramo L. Y Ferrari, S. (2010). Relación entre el potencial inóculo de *Thecaphora frezii* la intensidad de carbón del maní y el rendimiento del cultivo. Pag.24-26, en: Actas de resúmenes XXV Jornada Nacional del Maní.
  - Okoth S.A., Otadoh J.A. and Ochanda J.O. (2011). Improved seedling emergence and growth of maize and beans by *Trichoderma harziunum*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(1).
  - Oulas A., et. al. (2015). Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights*: 9 75–88. doi: 10.4137/BBI.S12462.
  - Ovrek L., (2000). Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3: 236-251.
  - Pace N.R., Stahl D.A., Olsen G.J., Lane D.J. (1986). Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* 51:4-12.
  - Partridge D.E., Jordan D.L., Bailey J.E. (2006) Management of *Sclerotinia* blight of peanut with the biological control agent *Coniothyrium minitans*. *Plant Dis* 90:957–963.
  - Pedelini, R. (2008). Maní. Guía práctica para su cultivo. Boletín de Divulgación Técnica N° 2. INTA. E.E.A. Manfredi. ISSN 1851-4081.
  - Perazzolli M., Roatti B., Bozza E., Pertot I. (2011). *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control* 58, 74–82.
  - Pereira e Silva M.C., Dias A.C.F., van Elsas J.D., Salles J.F. (2012). Spatial and Temporal Variation of Archaeal, Bacterial and Fungal Communities in Agricultural Soils. *PLoS ONE* 7(12): e51554.
  - Pereira e Silva M.C., Schloter-Hai B., Schloter M., van Elsas J.D., Salles J.F. (2013). Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen- Fixing Communities across Agricultural Soils. *PLoS ONE* 8(9): e74500.

- Pereira V.J., Fernandes D., Carvalho G., Benoliel M.J., San Romão M.V., Barreto Crespo M.T. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Microbial Ecology of Drinking Water and Waste Water Treatment Processes* 44, 4850–4859.
- Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S. & Van Wees S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5, 308–316.
- Pimentel D., (2009). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: Peshin R., Dhawan A.K. (eds.), *Integrated pest management: innovationdevelopment process, vol 1*. Springer, Dordrecht, pp 89–111
- Pimentel I.C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart R.M., Azevedo J.L. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Braz Arch Biol Technol* 49:705–711.
- Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. and Kublanov I.V. (2013). Characterization of *M elioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae*. *Environmental microbiology*, 15(6), pp.1759-1771.
- Postma J., Schilder M.T., Bloem J., van Leeuwen-Haagsma W.K. (2008). Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2394–2406.
- Prasad P.V.V., Boote K.J., Allen L.H., Thomas J.M.G. (2003). Super-optimal temperatures are detrimental to peanut (*Arachis hypogaea* L.) reproductive processes and yield at both ambient and elevated carbon dioxide. *Global Change Biol* 9:1775-1787.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., et al. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35(21):7188–96.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D590–6.
- Quince C., Lanzen A., Davenport R.J., Turnbaugh P.J. (2011). Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics*, 12:38.

- Raes J., Bork P. (2008). Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:693–99.
- Rago A.M., Cazón L.I., Paredes J.A., Molina J.P.E., Conforto E.C., Bisonard E.M., Oddino C., (2017). Peanut Smut: From an Emerging Disease to an Actual Threat to Argentine Peanut Production. *Plant Disease* 101, 400–408.
- Robinson D.A., Hockley N., Lebron I., Skow K.M., Reynolds B., Emmett B.A., Keith A.M., de Jonge L.W., Schjønning P., Moldrup P., et al. (2012). Natural capital, ecosystem services, and soil change: Why soil science must embrace an ecosystems approach. *Vadose Zone J.* <https://doi.org/10.2136/vzj2011.0051>
- Rodriguez R.J., White Jr J.F., Arnold A.E. and Redman R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), pp.314-330.
- Roesti D., Gaur R., Johri B.N., Imfeld G., Sharma S., Kawaljeet K. and Aragno M. (2006) Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol Biochem* 38, 1111–1120.
- Rojo F., Reynoso M., Ferez M., Chulze S., Torres A. (2007) Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* 26(4):549-555.
- Rotblat B., Enshell-Seijffers D., Gershoni J. M., Schuster S. & Avni A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* 32, 1049–1055.
- Ruocco M., Lanzuise S., Lombardi N., Woo S.L., Vinale F., Marra R., Varlese R., Manganiello G., Pascale A., Scala V., Turra D., Scala F., Lorito M. (2015). Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma* hydrophobin. *Mol Plant Microbe Interact* 28:167–179.
- Rutigliano F.A., Ascoli R.D. and De Santo A.V. (2004). Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. *Soil Biology & Biochemistry*, 36:1719-1729.
- Samolski I., Rincon A.M., Pinzon L.M., Viterbo A., Monte E. (2012). The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158:129–138.
- Sanders, T.H. (2001). Non-detectable levels of trans-fatty acids in peanut butter. *J Agric Food Chem* 49:2349–2351.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.



- Savazzini F., Longa C.M.O. and Pertot I. (2009). Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil biology and biochemistry*, 41(7), pp.1457-1465.
- Schafer K.S. and Kegley S. (2002). Persistent toxic chemicals in the US food supply, *J Epidemiol. Community Health* 56:813-817.
- Schirmböck M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P., (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4364–4370.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*; 75(23):7537–41.
- Schmidt T.M., DeLong E.F., Pace N.R. (1991). Analysis of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173: 4371-4378.
- Schmitz R.J., Schultz M.D., Urich M.A., *et al.* (2013). Patterns of population epigenomic diversity. *Nature* 495:193-198.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf A., *et al.* (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6241–6246.
- Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W.S., Huttenhower C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* 12, R60–R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Shannon C.E., Weaver W. (1949). The mathematical theory of communication., The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Champaign, IL, US.
- Sharma S., Gupta R., Dugar G., Srivastava A.K. (2012). Impact of Application of Biofertilizers on Soil Structure and Resident Microbial Community Structure and Function. In: Maheshwari D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–77.
- Sharpton T.J., (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front. Plant Sci.* 5:209.
- Simpson E., (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163:688.
- Singh A., Shukla N., Kabadwal B.C., Tewari A.K., Kumar J. (2018). Review on

- Plant-*Trichoderma*-Pathogen Interaction. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 7, 2382–2397.
- Singh D.P., Singh H.B., Prabha R. (2016). Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: functional applications, vol 2. Springer, New York, p 308.
  - Singh J.S., Pandey V.C. and Singh D.P. (2011) Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agr Ecosyst Environ* 140, 339–353.
  - Singh S., Nirmalkar V.K., Tiwari R.K.S., Jangre A. and Kumar P. (2017). Integration of *Trichoderma*, *Pseudomonas* and fungicides for the control of collar rot disease of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 10(1), 125-131.
  - Solbrig, O.T. (1991). From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. *Report of a IUBS-SCOPE UNESCO workshop, Harvard Forest, Petersham, Ma. USA*. IUBS.
  - Srivastava R., Khalid A., Singh U. S. & Sharma A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53, 24–31.
  - Stackebrandt E., Goebel B.M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 846–849.
  - Stepanova A.N., Yun J., Likhacheva A.V. & Alonso J.M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19, 2169–2185.
  - Stergiopoulos I., De Wit P.J.G.M. (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47:233-263.
  - Summons R.E., (1993). Biogeochemical Cycles A Review of Fundamental Aspects of Organic Matter Formation, Preservation, and Composition. In: Engel M. H. and Macko S. A (Eds), *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Plenum Press, New York, p.3-21.
  - Syed Ab Rahman S.F., Singh E., Pieterse C.M.J., Schenk P.M. (2017). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* 267, 102–111.
  - Szczech M., Nawrocka J., Felczyński K., Małolepsza U., Sobolewski J., Kowalska B., Maciorowski R., Jas K., Kancelista A. (2017). *Trichoderma atroviride* TRS25 isolate reduces downy mildew and induces systemic defence responses in

- cucumber in field conditions. *Scientia Horticulturae* 224, 17–26.
- Tabacchioni S., Chiaini L., Bevivino A., Cantale C. and Dalmastrì C. (2000). Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial ecology*, 40: 169-176.
  - Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2008: 1.
  - Theis K.R., Dheilly N.M., Klassen J.L., Brucker R.M., Baines J.F., *et al.*, (2016). Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems* 1:e00028-16.
  - Theron J., Cloete T.E. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol* 26, 37 – 57.
  - Thompson J.R., Marcelino L.A. and Polz M. F. (2002). Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by reconditioning PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 2083-2088.
  - Tonge D.P., Pashley C.H. and Gant T.W. (2014). Amplicon-based metagenomic analysis of mixed fungal samples using proton release amplicon sequencing. *PLoS ONE* 9:e93849.
  - Torsvik V. and L. Øvreås (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3): p. 240-245.
  - Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A. and Oveeas L. (1998). Review article: Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64: 53-62.
  - Trevors J.T., (1998). Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut*, 101, 45 – 67.
  - Tucci M., Ruocco M., De Masi L., De Palma M., Lorito M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology* 12, 341–354.
  - van Elsas J.D., Frois-Duarte G., Keijzer-Wolters A., Smit E., (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 43, 133 – 151.
  - van Elsas J.D., Trevors J.T. (1997). *Modern Soil Microbiology*. New York: Marcel Dekker.
  - Vandenkoornhuyse P., Baldauf S.L., Leyval C., Stracze K.J., Young J.P. (2002). Extensive fungal diversity in plants roots. *Science* 295: 2051.

- Vargas W.A., Mandawe J.C. & Kenerley C.M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol* 151, 792–808.
- Varon-Lopez M., Dias A.C.F., Cipolla Fasanella C., Durrer A., Soares Melo I., Kuramae E.E. and Dini Andreote F. (2014). Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. *Environmental Microbiology* 16(3), 845–855.
- Vázquez-Garcidueñas S., Leal-Morales C.A., Herrera-Estrella A., (1998). Analysis of the  $\beta$ -1, 3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1442–1446.
- Velivelli Siva L. S., De Vos P., Kromann P., Declerck S., Prestwich B. D. (2014). Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. *Trends in Biotechnology*, Volume 32, Issue 10, 493 – 496.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Valéro J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem Eng J* 37:1–20.
- Vey A., Hoagland R.E., Butt T.M. (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (eds), *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Bristol, pp 311-346.
- Vinale F., Nigro M., Sivasithamparam K., Flematti G., Ghisalberti E.L., Ruocco M., Varlese R., Marra R., Lanzuise S., Eid A., Woo S.L., Lorito M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* 347, 123–129.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., Woo S.L. & Lorito M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 72, 80–86.
- Viterbo A. & Chet I. (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* 7, 249–258.
- Viterbo A., Horwotz B.A. (2010). Mycoparasitism. In: Borkovich K.A., Ebbole D.J. (eds), *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. ASM Press, Herndon, pp. 676–694.
- Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L. & Chet I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* 305, 42–48.

- Von Wintzingerode F., Göbel U.B. and Stackebrandt U.B. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 213-229.
- Walkley A., Black I.A., (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37.
- Ward B.B., Voytek M.A. and Witzel R.P. (1997). Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia oxidizers investigated by specific PCR amplification. *Microbial Ecology* 33: 87–96.
- White J.R., Nagarajan N., Pop M. (2009). Statistical Methods for Detecting Differentially Abundant Features in Clinical Metagenomic Samples. *PLOS Computational Biology* 5, e1000352. doi:10.1371/journal.pcbi.1000352.
- White T., Bruns T., Lee S., Taylor J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Shinsky J., White T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315–322.
- Whittaker R.H., (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21: p. 213–251.
- Wiest A., Grzegorski D., Xu B., Goulard C., Rebuffat S., Ebbole D.J., Bodo B., Kenerley C. (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem* 277:20862- 20868.
- Xia H., Li Y.Y., Liu Z.C., Li Y.Q., Chen, J. (2018). Transgenic Expression of chit42 gene from *Metarhiziumanisopliae* in *Trichoderma harzianum* Enhances Antagonistic Activity against *Botrytis cinerea*. *Molecular Biology* 52, 668–675.
- Xu J., (2011). Microbial Ecology in the Age of Metagenomics. In: de Bruijn, Frans J. Hoboken NJ (eds), *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. USA: Wiley-Blackwell, pp. 113-122.
- Xu Y., Wang G., Jin J., Liu J., Zhang Q., Liu X. (2009). Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 919–925.
- Yan Y., Kuramae E.E., de Hollander M., Klinkhamer P.G.L., van Veen J.A. (2017). Functional traits dominate the diversity-related selection of bacterial communities in the rhizosphere. *The Isme Journal* 11, 56–66.

- Yang X., Chen L., Yong X. & Shen Q. (2011). Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against *Fusarium* wilt of cucumbers. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 239–248.
- Yedidia I., Benhamou N. & Chet I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65, 1061– 1070.
- Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y. & Chet I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235, 235–242.
- Zamioudis C., Pieterse C.M.J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25:139-150.
- Zhang F., Ge H., Zhang F., Guo N., Wang Y., Chen L., Ji X., Li C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 100, 64–74.
- Zhang F., Huo Y., Cobb A.B., Luo G., Zhou J., Yang G., Wilson G.W.T. and Zhang Y. (2018) *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass. *Front Microbiol* 9, 848.
- Zhang W. J., Rui W. Y., Tu C., Diab H. G., Louws F. J., Mueller J. P., Creamer N., Bell M., Waggener M. G. and Hu S. (2004). Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification. *Pedosphere*, 15(4): 440-447.
- Zheng Y., Zhang L.M., Zheng Y.M., Di H., He J.Z. (2008). Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments* 8, 406–414.

## 8. Anexo

### 8.1. Medios de cultivo

- Agar diclorán-rosa de bengala-cloranfenicol (DRBC): peptona 5 g, glucosa 10 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, diclorán 0,002 g, rosa de bengala 0,0025 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.
- Agar extracto de malta (MEA): extracto de malta 20 g, peptona 5 g, glucosa 20 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.
- Agar papa glucosado (APG): papa 250 g, glucosa 20 g, agar-agar 20 g, agua 1000 mL.
- Medio Selectivo para Trichoderma (TSM): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g, KCl 0,15 g, Rosa Bengala 0,15 g, Glucosa 3 g, Agar 20 g y llevar a 1000 ml con agua destilada. Posteriormente al ciclo de autoclavado a 121°C 15 min. Se adicionan al medio basal enfriado Cloranfenicol 0,25 g/ml y Solución streptomina 1%.
- Medio Heller y Theiler-Hedtrich: Jugo de tomate (Denominación comercial “V8”) 200 ml, agar 25 g y agregar 800 ml de agua. Posteriormente al ciclo de autoclavado a 121°C 15 min. Se adicionan al medio basal enfriado 1 ml de ácido láctico.
- Medio GVSM: Pesar 50 g de Triton en una botella y autoclavar. Añadir: 5 g de sal sódica de ácido propiónico, 500 mg de sulfato de estreptomina y 10 ml de una suspensión de Benomilo (contiene 40 mg de benomilo por 200 ml de acetona). Además, añadir 500 mg de Rifampicina en un tubo de polipropileno y posteriormente añadir 5 ml de metanol, mezclar inmediatamente, luego trasvasar en la botella. Disolver 500 mg de Rose Bengala en unos pocos ml de agua estéril e incorporarlo en la botella. Ajustar a 80 g con agua. Para hacer que GVSM use 8 mL del stock de antibióticos por 1L de PDA.

### 8.2. Soluciones

- Solución stock de rosa de bengala: 25 mg de rosa de bengala disueltos con 30 ml de etanol al 95% y se llevó a 100 mL con agua destilada.
- Solución stock de cloranfenicol: 250 mg de cloranfenicol disueltos en 100 mL de etanol al 95%.
- Solución stock de diclorán: 200 mg de diclorán se llevaron a 100 mL con etanol.

### 8.3. Microorganismos encontrados en el estudio de secuenciación masiva de amplicones

Detalle de leyenda “Otros” y “Bacterium” en histogramas de abundancia relativa

En las siguientes secciones se detallará cada una de las secuencias asignadas que fueron agrupadas dentro de la leyenda “Otros” y “Bacterium”. Además, con letra roja se resaltarán aquellos filotipos que presentaron variaciones y entre paréntesis se incluirán específicamente entre que muestras se produjo la variación. Siendo I: condición inicial o pre siembra, C: tratamiento control y Th: tratamiento peleteado con *T. harzianum* ITEM 3636. Además, 14-15 y 15-16 corresponden a las campañas 2014-2105 y 2015-2016, respectivamente.

#### Bacterias

##### Filo bacteriano

Otros

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria

k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia

**k\_\_Bacteria;p\_\_FCPU426 (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Fibrobacteres

**k\_\_Bacteria;p\_\_Ignavibacteriae (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria

**k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_RBG-1\_(Zixibacteria) (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria (C14-15 vs I14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Tectomicrobia (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_WS2

k\_\_Bacteria;p\_\_WS6



**Clase bacteriana**

## Otros

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_11  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_13  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_15  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_17  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_18 (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2 (I14-15 vs Th14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_22 (I14-15 vs Th14-15; C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_25 (C15-16 vs I15-16; C15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5 (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia (I15-16 vs Th15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_MB-A2-108  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Rubrobacteria (C15-16 vs I15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_TakashiAC-B11  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Fimbriimonadia (C14-15 vs I14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia (I14-15 vs Th14-15)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia (C15-16 vs I15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Anaerolineae (C15-16 vs I15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ardenticatenia (C15-16 vs I15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Gitt-GS-136  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG30-KF-CM66  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_KD4-96 (C14-15 vs Th14-15)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_P2-11E  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_S085 (I14-15 vs Th14-15)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SBR2076  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SHA-26  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SJA-15

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Thermomicrobia  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Cyanobacteria  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Melainabacteria  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia  
**k\_\_Bacteria;p\_\_FCPU426;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Fibrobacteres;c\_\_Fibrobacteria  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_BD2-11\_terrestrial\_group (I15-16 vs Th15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Longimicrobia  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_S0134\_terrestrial\_group (C15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Ignavibacteriae;c\_\_Ignavibacteria (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16 )**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Latescibacteria;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_Candidatus\_Magasanikbacteria (C14-15 vs I14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_OM190 (I14-15 vs Th14-15; C15-16 vs I15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Pla4\_lineage  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Planctomycetacia  
**k\_\_Bacteria;p\_\_RBG-1\_(Zixibacteria);c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs C14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Tectomicrobia;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Opitutae (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria  
**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Verrucomicrobiae (C14-15 vs I14-15)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_WS2;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**  
**k\_\_Bacteria;p\_\_WS6;c\_\_bacterium (I15-16 vs Th15-16)**

**Orden Bacteriano**

Bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_11;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_13;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_15;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_17;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_18;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_22;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_25;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_MB-A2-108;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_TakashiAC-B11;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ardenticatenia;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Gitt-GS-136;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG30-KF-CM66;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_KD4-96;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_P2-11E;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_S085;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SBR2076;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SJA-15;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_FCPU426;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_BD2-11\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_S0134\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Latescibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_Candidatus\_Magasanikbacteria;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_OM190;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_RBG-1\_(Zixibacteria);c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Tectomicrobia;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS2;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS6;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium

#### Otros

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteriales\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulesporales

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptomyetales (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Rubrobacteria;o\_\_Rubrobacterales (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Fimbriimonadia;o\_\_Fimbriimonadales (C14-15 vs I14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Anaerolineae;o\_\_Anaerolineales (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_C0119

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_JG30-KF-AS9

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Thermomicrobia;o\_\_JG30-KF-CM45

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Cyanobacteria;o\_\_SubsectionIII

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Melainabacteria;o\_\_Obscuribacterales

k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_Ila

**k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IV (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Fibrobacteres;c\_\_Fibrobacteria;o\_\_Fibrobacterales

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Lactobacillales

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Longimicrobia;o\_\_Longimicrobiales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Ignavibacteriae;c\_\_Ignavibacteria;o\_\_Ignavibacteriales (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae;o\_\_Phycisphaerales

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Planctomycetacia;o\_\_Planctomycetales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Alphaproteobacteria\_Incertae\_Sedis (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodobacterales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales (C15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales (C15-16 vs I15-16; C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Neisseriales (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15; C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_SC-I-84

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20 (C14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Bdellovibrionales (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfurellales (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfuromonadales (C14-15 vs I14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales (C14-15 vs I14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_NB1-j (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Oligoflexales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_SAR324\_clade(Marine\_group\_B) (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Syntrophobacterales (C15-16 vs Th15-16, I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Acidithiobacillales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Cellvibrionales (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacteriales

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_HTA4

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_KI89A\_clade

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Legionellales

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Oceanospirillales

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;o\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_Verrucomicrobia\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Opitutae;o\_\_Opitutales (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Verrucomicrobiae;o\_\_Verrucomicrobiales (C14-15 vs I14-15)**

## Familia Bacteriana

### Bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_11;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_13;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_15;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_17;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_18;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_22;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_25;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_MB-A2-108;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_TakashiAC-B11;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Gaiellales;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ardenticatenia;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Gitt-GS-136;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG30-KF-CM66;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_KD4-96;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_C0119;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_JG30-KF-AS9;f\_\_bacterium  
k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_P2-11E;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium



k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_S085;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SBR2076;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SJA-15;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Thermomicrobia;o\_\_JG30-KF-CM45;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Melainabacteria;o\_\_Obscuribacterales;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IIa;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IV;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_FCPU426;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_BD2-11\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_S0134\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Latescibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_Candidatus\_Magasanikbacteria;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_OM190;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_SC-I-84;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_NB1-j;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_SAR324\_clade(Marine\_group\_B);f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_HTA4;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_KI89A\_clade;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_bacterium  
 k\_\_Bacteria;p\_\_RBG-1\_(Zixibacteria);c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Tectomicrobia;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS2;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS6;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium

### Otros

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_ABS-19

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_NS72

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_Sva0725

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_Acidobacteria\_bacterium  
(C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_soil\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium  
(C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium  
(C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium  
(C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteriales\_bacterium;f\_\_Acidobacteriales\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiales\_Incertae\_Sedis

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Iamiaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulisporales;f\_\_Actinospicaceae  
(C15-16 vs I15-16; C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulisporales;f\_\_Catenulisporaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Mycobacteriaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Nocardiaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Acidothermaceae (C15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Cryptosporangiaceae (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Frankiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Nakamurellaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Sporichthyaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Cellulomonadaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Intrasporangiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Micrococcaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Promicromonosporaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardoidaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptomyetales;f\_\_Streptomyetaceae (C14-15 vs I14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Streptosporangiaceae (C14-15 vs Th14-15; C15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Rubrobacteria;o\_\_Rubrobacterales;f\_\_Rubrobacteriaceae (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Gaiellales;f\_\_Gaiellaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_0319-6M6 (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_288-2

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Conexibacteraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Elev-16S-1332

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_FCPU744

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_FFCH13075

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Gsoil-1167 (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Patulibacteraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_S1-80

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Solirubrobacteraceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_TM146 (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_YNPFFP1

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_p35j06ok

**k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales;f\_\_Chthonomonadaceae (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Fimbriimonadia;o\_\_Fimbriimonadales;f\_\_Fimbriimonadaceae (C14-15 vs I14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae (C14-15 vs I14-15; I14-15 vs Th14-15; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales;f\_\_Flavobacteriaceae (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales;f\_\_NS9\_marine\_group

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_AKYH767 (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_KD3-93

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_LiUU-11-161

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_NS11-12\_marine\_group (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_PHOS-HE51

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_ST-12K33

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Saprospiraceae (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Sphingobacteriaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_env.OPS\_17 (I14-15 vs Th14-15; C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_Parachlamydiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_Simkaniaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_cvE6

**k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales;f\_\_OPB56 (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales;f\_\_SJA-28

**k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Anaerolineae;o\_\_Anaerolineales;f\_\_Anaerolineaceae (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_FFCH7168

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_Roseiflexaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_Chloroflexi\_bacterium;f\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_Chloroflexi\_bacterium;f\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum;f\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Cyanobacteria;o\_\_SubsectionIII;f\_\_FamilyI

k\_\_Bacteria;p\_\_Fibrobacteres;c\_\_Fibrobacteria;o\_\_Fibrobacterales;f\_\_Fibrobacteraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Alicyclobacillaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Bacillaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Planococcaceae (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Lactobacillales;f\_\_Lactobacillaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Longimicrobia;o\_\_Longimicrobiales;f\_\_Longimicrobiaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Ignavibacteriae;c\_\_Ignavibacteria;o\_\_Ignavibacteriales;f\_\_BSV26 (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales;f\_\_0319-6A21 (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales;f\_\_Nitrospiraceae (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae;o\_\_Phycisphaerales;f\_\_Phycisphaeraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Planctomycetacia;o\_\_Planctomycetales;f\_\_Planctomycetaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Hyphomonadaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_A0839

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Beijerinckiaceae (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Bradyrhizobiaceae (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Brucellaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_DUNssu044 (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_JG34-KF-361

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_KF-JG30-B3 (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Phyllobacteriaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhodobiaceae (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_alpha\_cluster

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodobacterales;f\_\_Rhodobacteraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_AKYH478

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_DA111

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_I-10

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_JG37-AG-20 (C14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_KCM-B-15 (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_KCM-B-60

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_ML80

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MNC12

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MND8 (I14-15 vs Th14-15; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MSB-1E8

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_Holosporaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_Mitochondria (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_TK34 (C15-16 vs I15-16; C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Erythrobacteraceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_JG34-KF-161 (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Alcaligenaceae (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Burkholderiaceae (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales;f\_\_Methylophilaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Neisseriales;f\_\_Neisseriaceae (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15; C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20;f\_\_Burkholderiales\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Bdellovibrionales;f\_\_Bdellovibrionaceae (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfuromonadales;f\_\_Geobacteraceae (C14-15 vs I14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Archangiaceae (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Blrii41 (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Blfdi19

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Haliangiaceae (C14-15 vs I14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_KD3-10

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Myxococcaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Nannocystaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_P3OB-42

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Phaselicytidaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae (C14-15 vs I14-15; I14-15 vs Th14-15)**



**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Sandaracinaceae (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_bacteriap25

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Oligoflexales;f\_\_0319-6G20

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Syntrophobacterales;f\_\_Syntrophac eae (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Acidithiobacillales;f\_\_Thermithioba cillaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Cellvibrionales;f\_\_Cellvibrionaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacteriales;f\_\_Enterobacteri aceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Legionellales;f\_\_Coxiellaceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Oceanospirillales;f\_\_Halomonadac eae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Moraxellac eae (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Pseudomona daceae

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Nevskiaceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonada ceae (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomona daceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomon adales\_Incertae\_Sedis (C14-15 vs I14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;o\_\_Candidatus\_Sa ccharibacteria\_bacterium;f\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales;f\_\_Leptospiraceae (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales;f\_\_Spirochaetaceae (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_Verrucomicrobia\_bacterium;f\_\_Verrucomicrobia\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Opitutae;o\_\_Opitutales;f\_\_Opitutaceae (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Chthoniobacteraceae (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_DA101\_soil\_group

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Xiphinematobacteraceae

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Verrucomicrobiae;o\_\_Verrucomicrobiales;f\_\_Verrucomicrobiaceae (C14-15 vs I14-15)**

## Género

### Bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1);g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_ABS-19;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_NS72;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_Sva0725;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_soil\_bacterium;g\_\_soil\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_11;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_13;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_15;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_17;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_18;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_22;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_25;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Sporichthyaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_MB-A2-108;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_TakashiAC-B11;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Gaiellales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_0319-6M6;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_288-2;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Elev-16S-1332;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_FCPU744;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_FFCH13075;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Gsoil-1167;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_TM146;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_YNPFFP1;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_p35j06ok;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Fimbriimonadia;o\_\_Fimbriimonadales;f\_\_Fimbriimonadaeae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales;f\_\_NS9\_marine\_group;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_AKYH767;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_KD3-93;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_NS11-12\_marine\_group;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_PHOS-HE51;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_Saprospiraceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_Sphingobacteriaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacterales;f\_\_env.OPS\_17;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_Simkaniaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_cvE6;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales;f\_\_OPB56;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales;f\_\_SJA-28;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Anaerolineae;o\_\_Anaerolineales;f\_\_Anaerolineaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ardenticatenia;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_FFCH7168;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Gitt-GS-136;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG30-KF-CM66;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_KD4-96;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_C0119;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_JG30-KF-AS9;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_P2-11E;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_S085;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SBR2076;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SJA-15;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Thermomicrobia;o\_\_JG30-KF-CM45;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Melainabacteria;o\_\_Obscuribacterales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IIa;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IV;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_FCPU426;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_BD2-11\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Gemmatimonadetes;o\_\_Gemmatimonadales;f\_\_Gemmatimonadaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Longimicrobia;o\_\_Longimicrobiales;f\_\_Longimicrobiaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_S0134\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Ignavibacteriae;c\_\_Ignavibacteria;o\_\_Ignavibacteriales;f\_\_BSV26;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Latescibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales;f\_\_0319-6A21;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_Candidatus\_Magasanikbacteria;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_OM190;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Alphaproteobacteria\_Incertae\_Sedis;f\_\_Unknown\_Family;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_A0839;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Bradyrhizobiaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_DUNssu044;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_JG34-KF-361;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_KF-JG30-B3;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhodobiaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_alpha1\_cluster;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_AKYH478;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_DA111;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_I-10;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_JG37-AG-20;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_KCM-B-15;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_KCM-B-60;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_ML80;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MNC12;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MND8;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MSB-1E8;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_Holosporaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_TK34;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_JG34-KF-161;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Alcaligenaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales;f\_\_Methylophilaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Nitrosomonadales;f\_\_Nitrosomonadaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_SC-I-84;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Blrii41;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Blfdi19;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_KD3-10;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Nannocystaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_P3OB-42;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Sandaracinaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_bacteriap25;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_NB1-j;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Oligoflexales;f\_\_0319-6G20;g\_\_bacterium



k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_SAR324\_clade(Marine\_group\_B);f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Syntrophobacterales;f\_\_Syntrophaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_HTA4;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_KI89A\_clade;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Legionellales;f\_\_Coxiellaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonadaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_RBG-1\_(Zixibacteria);c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Tectomicrobia;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_DA101\_soil\_group;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS2;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS6;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Micrococcaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;  
g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_  
bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_b  
acterium

### Otros

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subg  
roup\_1);g\_\_Candidatus\_Koribacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subg  
roup\_1);g\_\_Edaphobacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Su  
bgroup\_1);g\_\_Granulicella (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgro  
up\_4);g\_\_11-24

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgro  
up\_4);g\_\_Aridibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgro  
up\_4);g\_\_Blastocatella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subg  
roup\_4);g\_\_DS-100 (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_  
Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup  
\_3);g\_\_Bryobacter (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_  
3);g\_\_Elev-16S-1166

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_  
3);g\_\_PAUC26f

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_b  
acterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteriales\_bacterium;f\_\_Acidobacteriales\_bacterium;g\_\_Acidobacteriales\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae;g\_\_CL500-29\_marine\_group (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae;g\_\_Illumatobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Aciditerrimonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Candidatus\_Microthrix

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Iamiaceae;g\_\_Iamia

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_bacterium;g\_\_actinobacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulisporales;f\_\_Actinospicaceae;g\_\_Actinospica (C15-16 vs I15-16; C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulisporales;f\_\_Catenulisporaceae;g\_\_Catenulispora

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Mycobacteriaceae;g\_\_Mycobacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Nocardiaceae;g\_\_Nocardia

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Nocardiaceae;g\_\_Rhodococcus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Acidothermaceae;g\_\_Acidothermus (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Frankiaceae;g\_\_Jatrophihabitans

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae;g\_\_Blastococcus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae;g\_\_Geodermatophilus (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae;g\_\_Mostobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Nakamurellaceae;g\_\_Nakamurella

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Sporichthyaceae;g\_\_Sporichthya

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae;g\_\_Angustibacter (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae;g\_\_Kineosporia (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Cellulomonadaceae;g\_\_Cellulomonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_Agromyces

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_Leifsonia

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_Microbacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Micrococcaceae;g\_\_Pseudarthrobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Promicromonosporaceae;g\_\_Promicromonospora

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Actinoplanes (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Asanoa

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Dactylosporangium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Hamadaea

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Krasilnikovia (I14-15 vs Th14-15; C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Longispora

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Luedemannella

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Micromonospora

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideae;g\_\_Aeromicrobium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideae;g\_\_Kribbella (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideae;g\_\_Marmoricola

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideae;g\_\_Nocardioides

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae;g\_\_Friedmanniella

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae;g\_\_Microlunatus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardieae;g\_\_Actinomycetospira (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardieae;g\_\_Actinophytocola

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardieae;g\_\_Amycolatopsis (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardieae;g\_\_Crossiella

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardieae;g\_\_Pseudonocardia

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardieae;g\_\_Sciscionella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptomycetales;f\_\_Streptomycetaceae;g\_\_Streptomyces (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Streptosporangiaceae;g\_\_Nonomurea (I14-15 vs Th14-15; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Streptosporangiaceae;g\_\_Streptosporangium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae;g\_\_Actinoallomurus

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae;g\_\_Actinocorallia

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae;g\_\_Actinomadura (C15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Rubrobacteria;o\_\_Rubrobacterales;f\_\_Rubrobacteriaceae;g\_\_Rubrobacter (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Gaiellales;f\_\_Gaiellaceae;g\_\_Gaiella

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Conexibacteraceae;g\_\_Conexibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Patulibacteraceae;g\_\_Patulibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Solirubrobacteraceae;g\_\_Solirubrobacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales;f\_\_Chthonomonadaceae;g\_\_Chthonomonas (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Adhaeribacter (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Chryseolina (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Cytophaga (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Ohtaekwangia

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Sporocytophaga (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales;f\_\_Flavobacteriaceae;g\_\_Flavobacterium (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Chitinophaga

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Ferruginibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Flavisolibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Flavitalea

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Niastella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Parafilimonas (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Segetibacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Taibaiella (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Terrimonas

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_LiUU-11-161;g\_\_Bacteroidetes\_bacterium (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Sphingobacteriaceae;g\_\_Mucilaginibacter (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Sphingobacteriaceae;g\_\_Pedobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_Parachlamydiaceae;g\_\_Candidatus\_Protochlamydia

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_Roseiflexaceae;g\_\_Roseiflexus

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_Chloroflexi\_bacterium;f\_\_Chloroflexi\_bacterium;g\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_Chloroflexi\_bacterium;f\_\_Chloroflexi\_bacterium;g\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum;f\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum;g\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Cyanobacteria;o\_\_SubsectionIII;f\_\_FamilyI;g\_\_Phormidium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Fibrobacteres;c\_\_Fibrobacteria;o\_\_Fibrobacterales;f\_\_Fibrobacteraceae;g\_\_possible\_genus\_04 (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Alicyclobacillaceae;g\_\_Tumebacillus

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Bacillaceae;g\_\_Oceanobacillus

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_Ammoniphilus

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_Cohnella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_Paenibacillus (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Planococcaceae;g\_\_Lysinibacillus

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Planococcaceae;g\_\_Sporosarcina

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Lactobacillales;f\_\_Lactobacillaceae;g\_\_Lactobacillus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_10 (C14-15 vs Th14-15; C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_8

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_9

**k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Gemmatimonadetes;o\_\_Gemmatimonadales;f\_\_Gemmatimonadaceae;g\_\_Gemmatirosa (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae;o\_\_Phycisphaerales;f\_\_Phycisphaeraceae;g\_\_AKYG587

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae;o\_\_Phycisphaerales;f\_\_Phycisphaeraceae;g\_\_SM1A02

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Planctomycetacia;o\_\_Planctomycetales;f\_\_Planctomycetaceae;g\_\_Singulisphaera

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae;g\_\_Brevundimonas (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae;g\_\_Phenylobacterium (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Hyphomonadaceae;g\_\_Hirschia (C15-16 vs I15-16)**



k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Hyphomonadaceae;g\_\_Woodsholea

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Bradyrhizobiaceae;g\_\_Bosea

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Brucellaceae;g\_\_Ochrobactrum

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Devosia

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Hyphomicrobium (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Pedomicrobium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Rhodomicrobium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Rhodoplanes

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_Methylobacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_Microvirga

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_Psychroglaciecola

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Phyllobacteriaceae;g\_\_Mesorhizobium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Phyllobacteriaceae;g\_\_Phyllobacterium (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiaceae;g\_\_Rhizobium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiaceae;g\_\_Shinella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Bauldia (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Nordella (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Phreatobacter (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_Labrys

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_Pseudolabrys

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_Variibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodobacterales;f\_\_Rhodobacteraceae;g\_\_Rubellimicrobium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Acidiphilium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Acidocella (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Craurococcus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Rhodopila (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Roseomonas

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_DA111;g\_\_alpha\_proteobacterium (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_Dongia

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_Inquilinus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_Skermanella (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Candidatus\_Alysiosphaera (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Geminicoccus (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Reyranella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Erythrobacteraceae;g\_\_Altererythrobacter (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Sphingomonadaceae;g\_\_Sphingobium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Sphingomonadaceae;g\_\_Sphingopyxis

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Alcaligenaceae;g\_\_Achromobacter (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Burkholderiaceae;g\_\_Burkholderia-Paraburkholderia (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Burkholderiaceae;g\_\_Cupriavidus

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Azohydromonas

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Caenimonas (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Comamonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Ideonella

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Polaromonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Ramlibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Rhizobacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Variovorax (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;g\_\_Duganella

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;g\_\_Janthinobacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;g\_\_Massilia

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;  
g\_\_Noviherbaspirillum

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales;f\_\_Methylophilaceae;  
g\_\_Methylophilus (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Neisseriales;f\_\_Neisseriaceae;g\_\_Pseudogulbenkiania (C15-16 vs I15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Neisseriales;f\_\_Neisseriaceae;g\_\_Vogesella (C15-16 vs I15-16; C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Nitrosomonadales;f\_\_Nitrosomonadaceae;  
g\_\_Nitrospira

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae;g\_\_Azoarcus

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae;g\_\_Uliginosibacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20;f\_\_Burkholderiales\_bacterium;g\_\_Burkholderiales\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Bdellovibrionales;f\_\_Bdellovibrionaceae;  
g\_\_Bdellovibrio

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Bdellovibrionales;f\_\_Bdellovibrionaceae;  
g\_\_OM27\_clade (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfurellales;f\_\_Desulfurellaceae;g\_\_G55

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfuromonadales;f\_\_Geobacteraceae;  
g\_\_Geobacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Archangiaceae;g\_\_Anaeromyxobacter (I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Haliangiaceae;g\_\_Haliangium (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Myxococcaceae;g\_\_Coralloccoccus

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Nannocystaceae;g\_\_Nannocystis

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Phaselicystidaceae;g\_\_Phaselicystis

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Minicystis

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Polyangium (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Sorangium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Sandaracinaceae;g\_\_Sandaracinus

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Acidithiobacillales;f\_\_Thermithiobacillaceae;g\_\_Thermithiobacillus

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Cellvibrionales;f\_\_Cellvibrionaceae;g\_\_Cellvibrio (I14-15 vs Th14-15; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacteriales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Arsenophonus (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacteriales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Enterobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacteriales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Escherichia-Shigella

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacteriales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Serratia

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Legionellales;f\_\_Coxiellaceae;g\_\_Aquicella

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Oceanospirillales;f\_\_Halomonadaceae;g\_\_Halomonas (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Moraxellaceae;g\_\_Acinetobacter (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Pseudomonadaceae;g\_\_Pseudomonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Nevskiaceae;g\_\_Nevskia

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonadaceae;g\_\_Polycyclovorans (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonadaceae;g\_\_Solimonas

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Arenimonas (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Dokdonella

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Dyella

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Luteibacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Luteimonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Lysobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Panacagrimonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Rhodanobacter

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Stenotrophomonas

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Tahibacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Acidibacter (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Steroidobacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;o\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;f\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;g\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium (C14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales;f\_\_Leptospiraceae;g\_\_Turnerella (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales;f\_\_Spirochaetaceae;g\_\_Spirochaeta\_2 (I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_Unknown\_Order;f\_\_Unknown\_Family;g\_\_Pedosphaera (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_Verrucomicrobia\_bacterium;f\_\_Verrucomicrobia\_bacterium;g\_\_Verrucomicrobia\_bacterium

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Opitutae;o\_\_Opitales;f\_\_Opitutaceae;g\_\_Opitutus (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Chthoniobacteraceae;g\_\_Chthoniobacter (C15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Xiphinematobacteraceae;g\_\_Candidatus\_Xiphinematobacter

**k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Verrucomicrobiae;o\_\_Verrucomicrobiales;f\_\_Verrucomicrobiaceae;g\_\_Prostheco bacter (C14-15 vs I14-15)**

### Especie

#### Bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1);g\_\_Candidatus\_Koribacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1);g\_\_Edaphobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1);g\_\_Granulicella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1);g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_11-24;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_Blastocatella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_RB41;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_ABS-19;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_NS72;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_10;f\_\_Sva0725;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_3);g\_\_Bryobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_3);g\_\_Candidatus\_Solibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_3);g\_\_Elev-16S-1166;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_3);g\_\_PAUC26f;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_11;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_13;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_15;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_17;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_18;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_22;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_25;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae;g\_\_CL500-29\_marine\_group;s\_\_bacterium



k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae;g\_\_Iumatobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Aciditerrimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Acidimicrobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Candidatus\_Microthrix;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_Iamiaceae;g\_\_Iamia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulisporales;f\_\_Actinospicaceae;g\_\_Actinospica;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Catenulisporales;f\_\_Catenulisporaceae;g\_\_Catenulispora;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Mycobacteriaceae;g\_\_Mycobacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Corynebacteriales;f\_\_Nocardiaceae;g\_\_Rhodococcus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Acidothermaceae;g\_\_Acidothermus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Frankiaceae;g\_\_Jatrophihabitans;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae;g\_\_Blastococcus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae;g\_\_Geodermatophilus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Geodermatophilaceae;g\_\_Mostobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Nakamurellaceae;g\_\_Nakamurella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Sporichthyaceae;g\_\_Sporichthya;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_Sporichthyaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Frankiales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae;g\_\_Angustibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae;g\_\_Kineosporia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Kineosporiales;f\_\_Kineosporiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Cellulomonadaceae;g\_\_Cellulomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_Agromyces;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_Leifsonia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_Microbacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Microbacteriaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Micrococcaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micrococcales;f\_\_Promicromonosporaceae;g\_\_Promicromonospora;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Actinoplanes;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Asanoa;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Dactylosporangium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Hamadaea;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Krasilnikovia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Longispora;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Luedemannella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_Micromonospora;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Micromonosporales;f\_\_Micromonosporaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideaceae;g\_\_Aeromicrobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideaceae;g\_\_Kribbella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideaceae;g\_\_Marmoricola;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Nocardioideaceae;g\_\_Nocardioides;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae;g\_\_Friedmanniella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae;g\_\_Microlunatus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Propionibacteriales;f\_\_Propionibacteriaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_Actinomycetospora;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_Actinophytocola;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_Crossiella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_Pseudonocardia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_Sciscionella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptomyetales;f\_\_Streptomyetaceae;g\_\_Streptomyces;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Streptosporangiaceae;g\_\_Nonomuraea;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Streptosporangiaceae;g\_\_Streptosporangium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae;g\_\_Actinoallomurus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae;g\_\_Actinocorallia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Streptosporangiales;f\_\_Thermomonosporaceae;g\_\_Actinomadura;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_MB-A2-108;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Rubrobacteria;o\_\_Rubrobacterales;f\_\_Rubrobacteriaceae;g\_\_Rubrobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_TakashiAC-B11;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Gaiellales;f\_\_Gaiellaceae;g\_\_Gaiella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Gaiellales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_0319-6M6;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_288-2;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Conexibacteraceae;g\_\_Conexibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Elev-16S-1332;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_FCPU744;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_FFCH13075;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Gsoil-1167;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Patulibacteraceae;g\_\_Patulibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_Solirubrobacteraceae;g\_\_Solirubrobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_TM146;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_YNPFFP1;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Thermoleophilia;o\_\_Solirubrobacterales;f\_\_p35J06ok;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales;f\_\_Chthonomonadaceae;g\_\_Chthonomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Chthonomonadetes;o\_\_Chthonomonadales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_Fimbriimonadia;o\_\_Fimbriimonadales;f\_\_Fimbriimonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Armatimonadetes;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Adhaeribacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Chryseolinea;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Cytophaga;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Ohtaekwangia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_Sporocytophaga;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Cytophagia;o\_\_Cytophagales;f\_\_Cytophagaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales;f\_\_Flavobacteriaceae;g\_\_Flavobacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Flavobacteriia;o\_\_Flavobacteriales;f\_\_NS9\_marine\_group;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_AKYH767;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Chitinophaga;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Ferruginibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Flavisolibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Flavitalea;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Niaistella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Parafilimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Segetibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Taibaiella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_Terrimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_KD3-93;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_NS11-12\_marine\_group;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_PHOS-HE51;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Saprospiraceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Sphingobacteriaceae;g\_\_Mucilaginibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Sphingobacteriaceae;g\_\_Pedobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Sphingobacteriaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_env.OPS\_17;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_Simkaniaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlamydiae;c\_\_Chlamydiae;o\_\_Chlamydiales;f\_\_cvE6;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales;f\_\_OPB56;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chlorobi;c\_\_Chlorobia;o\_\_Chlorobiales;f\_\_SJA-28;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Anaerolineae;o\_\_Anaerolineales;f\_\_Anaerolineaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ardenticatenia;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_FFCH7168;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_Roseiflexaceae;g\_\_Roseiflexus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Gitt-GS-136;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG30-KF-CM66;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_KD4-96;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_C0119;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Ktedonobacteria;o\_\_JG30-KF-AS9;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_P2-11E;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_S085;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SBR2076;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_SJA-15;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Thermomicrobia;o\_\_JG30-KF-CM45;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Cyanobacteria;o\_\_SubsectionIII;f\_\_FamilyI;g\_\_Phormidium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Melainabacteria;o\_\_Obscuribacterales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IIa;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Elusimicrobia;c\_\_Elusimicrobia;o\_\_Lineage\_IV;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_FCPU426;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Fibrobacteres;c\_\_Fibrobacteria;o\_\_Fibrobacterales;f\_\_Fibrobacteraceae;g\_\_possible\_genus\_04;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Alicyclobacillaceae;g\_\_Tumebacillus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Bacillaceae;g\_\_Bacillus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Bacillaceae;g\_\_Oceanobacillus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_Ammoniphilus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_Cohnella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Paenibacillaceae;g\_\_Paenibacillus;s\_\_bacterium



k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Planococcaceae;g\_\_Lysinibacillus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Bacillales;f\_\_Planococcaceae;g\_\_Sporosarcina;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Lactobacillales;f\_\_Lactobacillaceae;g\_\_Lactobacillus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_10;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_8;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae\_1;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_9;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_BD2-11\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Gemmatimonadetes;o\_\_Gemmatimonadales;f\_\_Gemmatimonadaceae;g\_\_Gemmatimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Gemmatimonadetes;o\_\_Gemmatimonadales;f\_\_Gemmatimonadaceae;g\_\_Gemmatirosa;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Gemmatimonadetes;o\_\_Gemmatimonadales;f\_\_Gemmatimonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_Longimicrobia;o\_\_Longimicrobiales;f\_\_Longimicrobiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Gemmatimonadetes;c\_\_S0134\_terrestrial\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Ignavibacteriae;c\_\_Ignavibacteria;o\_\_Ignavibacteriales;f\_\_BSV26;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Latescibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales;f\_\_0319-6A21;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales;f\_\_Nitrospiraceae;g\_\_Nitrospira;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_Candidatus\_Magasanikbacteria;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Parcubacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_OM190;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae;o\_\_Phycisphaerales;f\_\_Phycisphaeraceae;g\_\_AKYG587;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Phycisphaerae;o\_\_Phycisphaerales;f\_\_Phycisphaeraceae;g\_\_M1A02;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Planctomycetes;c\_\_Planctomycetacia;o\_\_Planctomycetales;f\_\_Planctomycetaceae;g\_\_Singulisphaera;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Alphaproteobacteria\_Incertae\_Sedis;f\_\_Unknown\_Family;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae;g\_\_Brevundimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae;g\_\_Phenylobacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Caulobacteraceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Hyphomonadaceae;g\_\_Hirschia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Hyphomonadaceae;g\_\_Woodsholea;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_A0839;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Bradyrhizobiaceae;g\_\_Bosea;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Bradyrhizobiaceae;g\_\_Bradyrhizobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Bradyrhizobiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_DUNssu044;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Devosia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Hyphomicrobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Pedomicrobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Rhodomicrobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_Rhodoplanes;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Hyphomicrobiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_JG34-KF-361;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_KF-JG30-B3;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_Methylobacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_Microvirga;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_Psychroglaciecola;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Methylobacteriaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Phyllobacteriaceae;g\_\_Mesorhizobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Phyllobacteriaceae;g\_\_Phyllobacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiaceae;g\_\_Rhizobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiaceae;g\_\_Shinella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Bauldia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Nordella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Phreatobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Rhizomicrobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Rhodobiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_Labrys;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_Pseudolabrys;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_Variibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_Xanthobacteraceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_alpha\_cluster;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhizobiales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodobacterales;f\_\_Rhodobacteraceae;g\_\_Rubellimicrobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_AKYH478;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Acidiphilium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Acidocella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Craurococcus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Rhodopila;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_Roseomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Acetobacteraceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_DA111;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_I-10;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_JG37-AG-20;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_KCM-B-15;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_KCM-B-60;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_ML80;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MNC12;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MND8;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_MSB-1E8;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_Dongia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_Inquilinus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_Skermanella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Candidatus\_Alysiosphaera;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Geminicoccus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_Rhodospirillales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Reyranela;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_Holosporaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rickettsiales;f\_\_TK34;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Erythrobacteraceae;g\_\_Altererythrobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_JG34-KF-161;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Sphingomonadaceae;g\_\_Sphingobium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Sphingomonadaceae;g\_\_Sphingomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_Sphingomonadaceae;g\_\_Sphingopyxis;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Sphingomonadales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Alcaligenaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Burkholderiaceae;g\_\_Burkholderia-Paraburkholderia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Burkholderiaceae;g\_\_Cupriavidus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Azohydromonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Comamonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Ramlibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_Rhizobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Comamonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;g\_\_Massilia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Burkholderiales;f\_\_Oxalobacteraceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales;f\_\_Methylophilaceae;g\_\_Methylophilus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales;f\_\_Methylophilaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Neisseriales;f\_\_Neisseriaceae;g\_\_Vogesella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Nitrosomonadales;f\_\_Nitrosomonadaceae;g\_\_Nitrosospira;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Nitrosomonadales;f\_\_Nitrosomonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae;g\_\_Azoarcus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae;g\_\_Uliginosibacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Rhodocyclales;f\_\_Rhodocyclaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_SC-I-84;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Bdellovibrionales;f\_\_Bdellovibrionaceae;g\_\_Bdellovibrio;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Bdellovibrionales;f\_\_Bdellovibrionaceae;g\_\_OM27\_clade;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfurellales;f\_\_Desulfurellaceae;g\_\_G55;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfurellales;f\_\_Desulfurellaceae;g\_\_H16;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Desulfuromonadales;f\_\_Geobacteraceae;g\_\_Geobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Archangiaceae;g\_\_Anaeromyxobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Blrii41;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Blfdi19;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Haliangiaceae;g\_\_Haliangium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_KD3-10;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Nannocystaceae;g\_\_Nannocystis;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Nannocystaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_P3OB-42;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Phaselicystidaceae;g\_\_Phaselicystis;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Minicystis;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Polyangium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Sorangium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Sandaracinaceae;g\_\_Sandaracinus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Sandaracinaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_bacteriap25;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_NB1-j;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Oligoflexales;f\_\_0319-6G20;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium



k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_SAR324\_clade(Marine\_group\_B);f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Syntrophobacterales;f\_\_Syntrophaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Acidithiobacillales;f\_\_Thermithiobacillaceae;g\_\_Thermithiobacillus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Cellvibrionales;f\_\_Cellvibrionaceae;g\_\_Cellvibrio;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacterales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Arsenophonus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacterales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Escherichia-Shigella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Enterobacterales;f\_\_Enterobacteriaceae;g\_\_Serratia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_HTA4;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_KI89A\_clade;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Legionellales;f\_\_Coxiellaceae;g\_\_Aquicella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Legionellales;f\_\_Coxiellaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Oceanospirillales;f\_\_Halomonadaceae;g\_\_Halomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Moraxellaceae;g\_\_Acinetobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Pseudomonadaceae;g\_\_Pseudomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Nevskiaceae;g\_\_Nevskia;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonadaceae;g\_\_Polycyclovorans;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonadaceae;g\_\_Solimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Solimonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Arenimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Dokdonella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Dyella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Luteibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Luteimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Lysobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Panacagrimonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Rhodanobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Stenotrophomonas;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_Tahibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Acidibacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis;g\_\_Steroidobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_Xanthomonadales\_Incertae\_Sedis;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Xanthomonadales;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_RBG-1\_(Zixibacteria);c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales;f\_\_Leptospiraceae;g\_\_Turnerella;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Spirochaetae;c\_\_Spirochaetes;o\_\_Spirochaetales;f\_\_Spirochaetaceae;g\_\_Spirochaeta\_2;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Tectomicrobia;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_Unknown\_Order;f\_\_Unknown\_Family;g\_\_Pedosphaera;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Opitutae;o\_\_Opitiales;f\_\_Opitutaceae;g\_\_Opitutus;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Chthoniobacteraceae;g\_\_Chthoniobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_DA101\_soil\_group;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Xiphinematobacteraceae;g\_\_Candidatus\_Xiphinematobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Verrucomicrobiae;o\_\_Verrucomicrobiales;f\_\_Verrucomicrobiaceae;g\_\_Prosthecobacter;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS2;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_WS6;c\_\_bacterium;o\_\_bacterium;f\_\_bacterium;g\_\_bacterium;s\_\_bacterium

### **Acidobacteria\_bacterium**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Acidobacteria;o\_\_Acidobacteriales;f\_\_Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1);g\_\_bacterium;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_11-24;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_DS-100;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Blastocatellia;o\_\_Blastocatellales;f\_\_Blastocatellaceae\_(Subgroup\_4);g\_\_RB41;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_3);g\_\_Bryobacter;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Solibacteres;o\_\_Solibacterales;f\_\_Solibacteraceae\_(Subgroup\_3);g\_\_Candidatus\_Solibacter;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_2;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_5;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteria\_bacterium;f\_\_Acidobacteria\_bacterium;g\_\_Acidobacteria\_bacterium;s\_\_Acidobacteria\_bacterium

#### **Alpha\_proteobacterium**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Caulobacterales;f\_\_Hyphomonadaceae;g\_\_Woodsholea;s\_\_alpha\_proteobacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Alphaproteobacteria;o\_\_Rhodospirillales;f\_\_DA111;g\_\_alpha\_proteobacterium;s\_\_alpha\_proteobacterium

#### **Chloroflexi\_bacterium**

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_JG37-AG-4;o\_\_Chloroflexi\_bacterium;f\_\_Chloroflexi\_bacterium;g\_\_Chloroflexi\_bacterium;s\_\_Chloroflexi\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_TK10;o\_\_Chloroflexi\_bacterium;f\_\_Chloroflexi\_bacterium;g\_\_Chloroflexi\_bacterium;s\_\_Chloroflexi\_bacterium

#### **Beta\_proteobacterium**

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Methylophilales;f\_\_Methylophilaceae;g\_\_bacterium;s\_\_beta\_proteobacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_Nitrosomonadales;f\_\_Nitrosomonadaceae;g\_\_bacterium;s\_\_beta\_proteobacterium

#### **Soil\_bacterium**

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Holophagae;o\_\_Subgroup\_7;f\_\_soil\_bacterium;g\_\_soil\_bacterium;s\_\_soil\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Anaerolineae;o\_\_Anaerolineales;f\_\_Anaerolineaceae;g\_\_bacterium;s\_\_soil\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Chloroflexi;c\_\_Chloroflexia;o\_\_Chloroflexales;f\_\_Roseiflexaceae;g\_\_Roseiflexus;s\_\_soil\_bacterium

### Otros

k\_\_Bacteria;p\_\_Acidobacteria;c\_\_Subgroup\_6;o\_\_Acidobacteriales\_bacterium;f\_\_Acidobacteriales\_bacterium;g\_\_Acidobacteriales\_bacterium;s\_\_Acidobacteriales\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Acidimicrobiia;o\_\_Acidimicrobiales;f\_\_bacterium;g\_\_actinobacterium;s\_\_actinobacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteria;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Pseudonocardiales;f\_\_Pseudonocardiaceae;g\_\_Pseudonocardia;s\_\_Pseudonocardia\_halophobica

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_Chitinophagaceae;g\_\_bacterium;s\_\_Chitinophagaceae\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidetes;c\_\_Sphingobacteriia;o\_\_Sphingobacteriales;f\_\_LiUU-11-161;g\_\_Bacteroidetes\_bacterium;s\_\_Bacteroidetes\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Cyanobacteria;c\_\_Chloroplast;o\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum;f\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum;g\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum;s\_\_Bryum\_argenteum\_var.\_argenteum

k\_\_Bacteria;p\_\_Nitrospirae;c\_\_Nitrospira;o\_\_Nitrospirales;f\_\_Nitrospiraceae;g\_\_Nitrospira;s\_\_Nitrospira\_sp.

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Betaproteobacteria;o\_\_TRA3-20;f\_\_Burkholderiales\_bacterium;g\_\_Burkholderiales\_bacterium;s\_\_Burkholderiales\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Deltaproteobacteria;o\_\_Myxococcales;f\_\_Polyangiaceae;g\_\_Sorangium;s\_\_Sorangium\_cellulosum

k\_\_Bacteria;p\_\_Proteobacteria;c\_\_Gammaproteobacteria;o\_\_Pseudomonadales;f\_\_Pseudomonadaceae;g\_\_Pseudomonas;s\_\_Oryzias\_melastigma\_(Indian\_medaka)

k\_\_Bacteria;p\_\_Saccharibacteria;c\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;o\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;f\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;g\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium;s\_\_Candidatus\_Saccharibacteria\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_OPB35\_soil\_group;o\_\_Verrucomicrobia\_bacterium;f\_\_Verrucomicrobia\_bacterium;g\_\_Verrucomicrobia\_bacterium;s\_\_Verrucomicrobia\_bacterium

k\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobia;c\_\_Spartobacteria;o\_\_Chthoniobacterales;f\_\_Chthoniobacteraceae;g\_\_Chthoniobacter;s\_\_Verrucomicrobia\_bacterium

**Hongos****Clase fúngica****Incertae sedis**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae sedis

**Otros**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Orbiliomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Atractiellomyces

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Cystobasidiomyces**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Microbotryomyces

**Orden Fúngico****Incertae sedis**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomyces;o\_\_Incertae sedis**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Incertae sedis**

**Otros**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Orbiliomyces;o\_\_Orbiliales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomyces;o\_\_Pezizales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomyces;o\_\_Saccharomycetales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Chaetosphaeriales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Coniochaetales

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Diaporthales**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Melanosporales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Trichosphaerales

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Auriculariales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Corticiales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Geastrales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Polyporales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Sebacinales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Trechisporales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Atractiellomycetes;o\_\_Atractiellales

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Cystobasidiomycetes;o\_\_Erythrobasidiales**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Malasseziales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Microbotryomycetes;o\_\_Sporidiobolales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Filobasidiales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Ustilaginomycetes;o\_\_Ustilaginales

**k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Chytridiales**

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Olpidiales

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophlyctidales

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophydiales

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Diversisporales

**k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Glomerales**

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Paraglomerales

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Kickxellales

## Clase Fúngica

### Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomycetes;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Trichosphaeriales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Cystobasidiomycetes;o\_\_Erythrobasidiales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Malasseziales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Microbotryomycetes;o\_\_Sporidiobolales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Chytridiales;f\_\_Incertae sedis

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophydiales;f\_\_Incertae sedis

### Otros

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Capnodiales;f\_\_Mycosphaerellaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Eremomycetaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Myxotrichaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Pseudeurotiaceae



k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Corynesporascaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Cucurbitariaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Leptosphaeriaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Lophiostomataceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Massarinaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Phaeosphaeriaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleomassariaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleosporaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Chaetothyriaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Onygenales;f\_\_Ajellomycetaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Sclerotiniaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Vibrisseaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Orbiliomyces;o\_\_Orbiliales;f\_\_Orbiliaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomyces;o\_\_Pezizales;f\_\_Ascobolaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomyces;o\_\_Pezizales;f\_\_Pezizaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomyces;o\_\_Pezizales;f\_\_Pyronemataceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomyces;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Pichiaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Coniochaetales;f\_\_Coniochaetaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Diaporthales;f\_\_Diaporthaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Diaporthales;f\_\_Togniniaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Bionectriaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Cordycipitaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Annulatasceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Glomerellaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Plectosphaerellaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Melanosporales;f\_\_Ceratostomataceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_Halosphaeriaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_Microascaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Cephalothecaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Hyponectriaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Xylariaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Agaricaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Bolbitiaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Entolomataceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Inocybaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Lycoperdaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Marasmiaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Niaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Ceratobasidiaceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Corticiales;f\_\_Corticiaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Geastrales;f\_\_Geastraceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Polyporales;f\_\_Polyporaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Trechisporales;f\_\_Hydnodontaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Filobasidiales;f\_\_Filobasidiaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Ustilaginomycetes;o\_\_Ustilaginales;f\_\_Ustilaginaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Olpidiales;f\_\_Olpidiaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophlyctidales;f\_\_Rhizophlyctidaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales;f\_\_Spizellomycetaceae

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Diversisporales;f\_\_Acaulosporaceae

**k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Glomerales;f\_\_Glomeraceae**

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Kickxellales;f\_\_Kickxellaceae

## Géneros fúngicos

### Otros

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Capnodiales;f\_\_Davidiellaceae;g\_\_Cladosporium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Capnodiales;f\_\_Mycosphaerellaceae;g\_\_Mycosphaerella

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Capnodiales;f\_\_Mycosphaerellaceae;g\_\_Ramularia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Eremomycetaceae;g\_\_Arthrographis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Minutisphaera

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Myxotrichaceae;g\_\_Oidiodendron**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Pseudeurotiaceae;g\_\_Pseudogymnoascus**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Corynesporascaceae;g\_\_Corynespora

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Cucurbitariaceae;g\_\_Pyrenochaetopsis

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Ochrocladosporium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Stagonosporopsis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Leptosphaeriaceae;g\_\_Leptosphaeria

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Leptosphaeriaceae;g\_\_Neoseotophoma

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Lophiostomataceae;g\_\_Lophiostoma

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Massarinaceae;g\_\_Saccharicola

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Phaeosphaeriaceae;g\_\_Phaeosphaeria

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Phaeosphaeriaceae;g\_\_Stagonospora

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleosporaceae;g\_\_Bipolaris

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleosporaceae;g\_\_Curvularia

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleosporaceae;g\_\_Pleospora**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Preussia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Westerdykella

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Chaetothyriaceae;g\_\_Cyphellophora**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Capronia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Cladophialophora

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Exophiala

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Paecilomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Talaromyces

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Onygenales;f\_\_Ajellomycetaceae;g\_\_Spiromastix

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Phialemoniopsis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Torula

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Vermispora

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Scytalidium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Xylogone

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Vibrisseaceae;g\_\_Phialocephala

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Orbiliomyces;o\_\_Orbiliales;f\_\_Orbiliaceae;g\_\_Monacrosporium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomyces;o\_\_Pezizales;f\_\_Pezizaceae;g\_\_Peziza

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomyces;o\_\_Pezizales;f\_\_Pyronemataceae;g\_\_Pseudaleuria**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomyces;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Candida

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomyces;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Debaryomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomyces;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Pichiaceae;g\_\_Yamadaz yma

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae;g\_\_Chaetosphaeria

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae;g\_\_Chloridium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae;g\_\_Codinaeopsis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Coniochaetales;f\_\_Coniochaetaceae;g\_\_Conio chaeta

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Diaporthales;f\_\_Diaporthaceae;g\_\_Phomopsis

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Diaporthales;f\_\_Togniniaceae;g\_\_Phaeoacromonium**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Hypocreales;f\_\_Bionectriaceae;g\_\_Clonostachys**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Hypocreales;f\_\_Bionectriaceae;g\_\_Stephanone ctria

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Metarhizium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Nomurea

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Pochonia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomyces;o\_\_Hypocreales;f\_\_Cordycipitaceae;g\_\_Beauveria

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Cordycipitaceae;g\_\_Lecanicillium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Hypocreaceae;g\_\_Acrostalagmus

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Hypocreaceae;g\_\_Trichoderma**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Acremonium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Ilyonectria

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Myrothecium

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Sarocladium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Stachybotrys

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Cylindrocarpon

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Fusicolla

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Haematonecristia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Neonecristia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Volutella

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae;g\_\_Polyccephalomyces

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae;g\_\_Purpureocillium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Annulatasceae;g\_\_Conlarium

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Glomerellaceae;g\_\_Colletotrichum**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Myrmecridium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Savoryella

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae  
sedis;f\_\_Plectosphaerellaceae;g\_\_Lectera

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Melanosporales;f\_\_Ceratostomataceae;g\_\_Har  
zia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_Microascaceae;g\_\_Scedospori  
um

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Cephalothecaceae;g\_\_Phiale  
monium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Chaetomiaceae;g\_\_Chaetomidi  
um

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Chaetomiaceae;g\_\_Chaetomi  
um

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Chaetomiaceae;g\_\_Humicola**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Arnium

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Cercopho  
ra

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Zopfiella

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Microdochium**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Monosporascus

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Xylariaceae;g\_\_Xylaria

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Agaricaceae;g\_\_Arachnion

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Agaricaceae;g\_\_Calvatia

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Agaricaceae;g\_\_Lepiota

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Bolbitiaceae;g\_\_Conocybe

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Entolomataceae;g\_\_Clitopilus**

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Entolomataceae;g\_\_Entolom  
a**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Inocybaceae;g\_\_Crepidotus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Marasmiaceae;g\_\_Marasmius

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Niaceae;g\_\_Flagelloscypha**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Coprinellus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Coprinopsis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Psathyrella

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Ceratobasidiaceae;g\_\_Ceratobasidium

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Ceratobasidiaceae;g\_\_Thaanatephorus**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Minimedusa

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Corticiales;f\_\_Corticiaceae;g\_\_Waitea

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Geastrales;f\_\_Geastraceae;g\_\_Geastrum

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Polyporales;f\_\_Polyporaceae;g\_\_Coriolopsis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Trechisporales;f\_\_Hydnodontaceae;g\_\_Trechispora

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Cystobasidiomycetes;o\_\_Erythrobasidiales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Erythrobasidium**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Malasseziales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Malassezia

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Microbotryomycetes;o\_\_Sporidiobolales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Sporobolomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Filobasidiales;f\_\_Filobasidiaceae;g\_\_Cryptococcus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Cryptococcus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Hannaella

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Ustilaginomycetes;o\_\_Ustilaginales;f\_\_Ustilaginaceae;g\_\_Ustilago

**k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Chytridiales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Delfinachytrium**

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Olpidiales;f\_\_Olpidiaceae;g\_\_Olpidium

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophlyctidales;f\_\_Rhizophlyctidaceae;g\_\_Rhizophlyctis



k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophydiales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Operculomyces

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales;f\_\_Spizellomycetaceae;g\_\_Powellomyces

**k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales;f\_\_Spizellomycetaceae;g\_\_Spizellomyces**

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Diversisporales;f\_\_Acaulosporaceae;g\_\_Entrophospora

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Glomerales;f\_\_Glomeraceae;g\_\_Glomus

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Glomerales;f\_\_Glomeraceae;g\_\_Rhizoglyphus

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Kickxellales;f\_\_Kickxellaceae;g\_\_Ramicandelaber

### Especies fúngicas

#### Otros

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Capnodiales;f\_\_Davidiellaceae;g\_\_Cladosporium;s\_\_Cladosporium halotolerans

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Capnodiales;f\_\_Mycosphaerellaceae;g\_\_Mycosphaerella;s\_\_Mycosphaerella berkeleyi

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Eremomycetaceae;g\_\_Arthrographis;s\_\_Arthrographis curvata

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Minutisphaera;s\_\_Minutisphaera japonica

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Myxotrichaceae;g\_\_Oidiodendron;s\_\_Oidiodendron cereale (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Pseudeurotiaceae;g\_\_Pseudogymnoascus;s\_\_Pseudogymnoascus roseus (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Corynesporascaceae;g\_\_Corynespora;s\_\_Corynespora cassiicola

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Cucurbitariaceae;g\_\_Pyrenochaetopsis;s\_\_Pyrenochaetopsis leptospora

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Ochrocladosporium;s\_\_Ochrocladosporium sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Periconia;s\_\_Periconia sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Stagonosporopsis;s\_\_Stagonosporopsis dorenboschii

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Leptosphaeriaceae;g\_\_Leptos  
phaeria;s\_\_Leptosphaeria sp MH\_2001

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Leptosphaeriaceae;g\_\_Neose  
tophoma;s\_\_Neosetophoma sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Phaeosphaeriaceae;g\_\_Phae  
osphaeria;s\_\_Phaeosphaeria sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Phaeosphaeriaceae;g\_\_Stago  
nospora;s\_\_Stagonospora sp AX113

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleomassariaceae;g\_\_unident  
ified;s\_\_Pleomassariaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleosporaceae;g\_\_Curvularia;  
s\_\_Curvularia heteropogonis

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Pleosporaceae;g\_\_Pleospor  
a;s\_\_Pleospora herbarum (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Preussia;s  
\_\_Preussia flanaganii

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Preussia;s  
\_\_Preussia sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Preussia;s  
\_\_Preussia sp BSH29

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Preussia;s  
\_\_Preussia sp GP\_2006a

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Preussia;s  
\_\_Preussia terricola

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_Sporormiaceae;g\_\_Westerdy  
kella;s\_\_Westerdykella ornata

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Dothideomycetes;o\_\_Pleosporales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified;  
s\_\_Pleosporales sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Capronia;s\_\_Capronia sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Cladophialophora;s\_\_Cladophialophora chaetospira

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Exophiala;s\_\_Exophiala equina

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Chaetothyriales;f\_\_Herpotrichiellaceae;g\_\_Exophiala;s\_\_Exophiala pisciphila

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Aspergillus;s\_\_Aspergillus cibarius (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Aspergillus;s\_\_Aspergillus pseudodeflectus

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Paecilomyces;s\_\_Paecilomyces marquandii

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Penicillium;s\_\_Penicillium camemberti (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Penicillium;s\_\_Penicillium roseopurpureum (C14-15 vs I14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Penicillium;s\_\_Penicillium sp SW\_2014e

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Eurotiales;f\_\_Trichocomaceae;g\_\_Talaromyces;s\_\_Talaromyces purpurogenus

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Onygenales;f\_\_Ajellomycetaceae;g\_\_Spiromastix;s\_\_Spiromastix warcupii

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Eurotiomycetes;o\_\_Onygenales;f\_\_Onygenaceae;g\_\_Chrysosporium;s\_\_Chrysosporium sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Torula;s\_\_Torula sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Vermispora;s\_\_Vermispora fusarina

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_unidentified;s\_\_Ascomycota sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomyces;o\_\_Helotiales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Scytalidium;s\_\_Scytalidium sp TMS\_2011 (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomycetes;o\_\_Helotiales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Xylogone;s\_\_Xylogone sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Leotiomycetes;o\_\_Helotiales;f\_\_Vibrisseaceae;g\_\_Phialocephala;s\_\_  
Phialocephala humicola

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Orbiliomycetes;o\_\_Orbiliales;f\_\_Orbiliaceae;g\_\_Monacrosporium;  
s\_\_Monacrosporium elegans (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Orbiliomycetes;o\_\_Orbiliales;f\_\_Orbiliaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Orb  
iliaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomycetes;o\_\_Pezizales;f\_\_Ascobolaceae;g\_\_unidentified;s\_\_As  
cobolaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomycetes;o\_\_Pezizales;f\_\_Pezizaceae;g\_\_Peziza;s\_\_Peziza  
ammophila

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomycetes;o\_\_Pezizales;f\_\_Pezizaceae;g\_\_Peziza;s\_\_Peziza sp  
KH\_00020

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Pezizomycetes;o\_\_Pezizales;f\_\_Pyronemataceae;g\_\_Pseudaleuria;s\_\_  
Pseudaleuria sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomycetes;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Candida;s\_\_Candida xylopsoci

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomycetes;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Candida;s\_\_Candida zeylanoides (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomycetes;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Debaryomyces;s\_\_Debaryomyces prosopidis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Saccharomycetes;o\_\_Saccharomycetales;f\_\_Pichiaceae;g\_\_Yamadaz  
yma;s\_\_Yamadazyma triangularis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae;g\_\_  
Chaetosphaeria;s\_\_Chaetosphaeria sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae;g\_\_  
Chloridium;s\_\_Chloridium sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Chaetosphaeriales;f\_\_Chaetosphaeriaceae;g\_\_  
Codinaeopsis;s\_\_Codinaeopsis sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Coniochaetales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentifie  
d;s\_\_Coniochaetales sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Diaporthales;f\_\_Diaporthaceae;g\_\_Phomopsis;  
s\_\_Phomopsis sp C\_1\_BESC\_294j

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Diaporthales;f\_\_Togniniaceae;g\_\_Phaeoacremonium;s\_\_Phaeoacremonium hungaricum (C15-16 vs Th15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Bionectriaceae;g\_\_Clonostachys;s\_\_Clonostachys rosea f. catenulata (C14-15 vs Th14-15; I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Bionectriaceae;g\_\_Stephanonectria;s\_\_Stephanonectria sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Bionectriaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Bionectriaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Metarhizium;s\_\_Metarhizium pinghaense

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Nomuraea;s\_\_Nomuraea rileyi

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Pochonia;s\_\_Pochonia chlamydosporia

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Clavicipitaceae;g\_\_Pochonia;s\_\_Pochonia sp NBRC 104298

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Cordycipitaceae;g\_\_Beauveria;s\_\_Beauveria amorpha

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Cordycipitaceae;g\_\_Lecanicillium;s\_\_Lecanicillium primulinum

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Hypocreaceae;g\_\_Acrostalagmus;s\_\_Acrostalagmus luteoalbus

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Acremonium;s\_\_Acremonium pilosum

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Myrothecium;s\_\_Myrothecium sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Sarocladium;s\_\_Sarocladium strictum (C15-16 vs I15-16)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Stachybotrys;s\_\_Stachybotrys cf elegans HGUP 0208

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Stachybotrys;s\_\_Stachybotrys microspora

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Cylindrocarpon;s\_\_Cylindrocarpon sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Fusicolla;s\_\_Fusicolla acetilerea

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Fusicolla;s\_\_Fusicolla violacea

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Haematonectria;s\_\_Haematonectria haematococca

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Nectriaceae;g\_\_Neonectria;s\_\_Neonectria sp SMr01

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae;g\_\_Polycephalomyces;s\_\_Polycephalomyces sinensis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae;g\_\_Purpureocillium;s\_\_Purpureocillium lavendulum

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae;g\_\_Purpureocillium;s\_\_Purpureocillium lilacinum

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Hypocreales;f\_\_Ophiocordycipitaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Ophiocordycipitaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Annulatascaceae;g\_\_Conlarium;s\_\_Conlarium duplumascospora

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Glomerellaceae;g\_\_Colletotrichum;s\_\_Colletotrichum chlorophyti (C14-15 vs I14-15; C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Myrmecridium;s\_\_Myrmecridium sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Savoryella;s\_\_Savoryella aquatica

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Plectosphaerellaceae;g\_\_Lectera;s\_\_Lectera longa

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Incertae sedis;f\_\_Plectosphaerellaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Plectosphaerellaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Melanosporales;f\_\_Ceratostomataceae;g\_\_Harzia;s\_\_Harzia acremonioides

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_Halosphaeriaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Halosphaeriaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_Microascaceae;g\_\_Scedosporium;s\_\_Scedosporium prolificans

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_Microascaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Microascaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Microascales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified;s\_\_Microascales sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Cephalothecaceae;g\_\_Phialemonium;s\_\_Phialemonium globosum (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Chaetomiaceae;g\_\_Chaetomidium;s\_\_Chaetomidium galaicum

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Chaetomiaceae;g\_\_Chaetomium;s\_\_Chaetomium erectum

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Chaetomiaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Chaetomiaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Arnium;s\_\_Arnium sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Cercophora;s\_\_Cercophora sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Podospora;s\_\_Podospora communis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Podospora;s\_\_Podospora dakotensis

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Podospora;s\_\_Podospora decipiens

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Podospora;s\_\_Podospora myriaspora

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Podospora;s\_\_Podospora sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Podospora;s\_\_Podospora sp SS\_1396 (C15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Zopfiella;s\_\_Zopfiella marina (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_Zopfiella;s\_\_Zopfiella sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Sordariales;f\_\_Lasiosphaeriaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Lasiosphaeriaceae sp

k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Hyponectriaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Hyponectriaceae sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Microdochium;s\_\_Microdochium bolleyi (C15-16 vs I15-16; I15-16 vs Th15-16)**

**k\_\_Fungi;p\_\_Ascomycota;c\_\_Sordariomycetes;o\_\_Xylariales;f\_\_Incertae sedis;g\_\_Microdochium;s\_\_Microdochium sp E9329c (C14-15 vs I14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Agaricaceae;g\_\_Arachnion;s\_\_Arachnion album

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Agaricaceae;g\_\_Calvatia;s\_\_Calvatia fragilis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Bolbitiaceae;g\_\_Conocybe;s\_\_Conocybe pseudocrispa

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Entolomataceae;g\_\_Clitopilus;s\_\_Clitopilus sp

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Lycoperdaceae;g\_\_unidentified;s\_\_Lycoperdaceae sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Niaceae;g\_\_Flagelloscypha;s\_\_Flagelloscypha minutissima (C14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Coprinellus;s\_\_Coprinellus bisporus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Coprinellus;s\_\_Coprinellus eurysporus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Coprinellus;s\_\_Coprinellus xanthothrix

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Agaricales;f\_\_Psathyrellaceae;g\_\_Coprinopsis;s\_\_Coprinopsis calospora

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Auriculariales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified;s\_\_Auriculariales sp

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Ceratobasidiaceae;g\_\_Thanatephorus;s\_\_Thanatephorus sp

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Ceratobasidiaceae;g\_\_Thanatephorus;s\_\_Thanatephorus sp 22\_03



k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Cantharellales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Minimedusa;s\_\_Minimedusa sp

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Corticiales;f\_\_Corticiaceae;g\_\_Waitea;s\_\_Rhi  
zoctonia oryzae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Geastrales;f\_\_Geastraceae;g\_\_Geastrum;s\_\_  
Geastrum saccatum

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Agaricomycetes;o\_\_Sebacinales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified;s\_\_  
Sebacinales sp

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Atractiellomycetes;o\_\_Atractiellales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentifi  
ed;s\_\_Atractiellales sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Cystobasidiomycetes;o\_\_Erythrobasidiales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Erythrobasidium;s\_\_Erythrobasidium hasegawianum (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Malasseziales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Malassezia;s\_\_Malassezia globosa

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Incertae sedis;o\_\_Malasseziales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Malassezia;s\_\_Malassezia restricta

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Microbotryomycetes;o\_\_Sporidiobolales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Sporobolomyces;s\_\_Sporobolomyces symmetricus

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Filobasidiales;f\_\_Filobasidiaceae;g\_\_Crypto  
coccus;s\_\_Cryptococcus cerealis

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Filobasidiales;f\_\_Filobasidiaceae;g\_\_Crypt  
ococcus;s\_\_Cryptococcus terreus (I15-16 vs Th15-16)**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Cryptococcus;s\_\_Cryptococcus aerius

**k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Cryptococcus;s\_\_Cryptococcus laurentii (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Hannaella;s\_\_Hannaella oryzae

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Tremellomycetes;o\_\_Tremellales;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified  
;s\_\_Tremellales sp

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Ustilaginomycetes;o\_\_Ustilaginales;f\_\_Ustilaginaceae;g\_\_Ustilag  
o;s\_\_Ustilago maydis

k\_\_Fungi;p\_\_Basidiomycota;c\_\_Ustilaginomycetes;o\_\_Ustilaginales;f\_\_Ustilaginaceae;g\_\_unident  
ified;s\_\_Ustilaginaceae sp

**k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Chytridiales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Delfinachytrium;s\_\_Delfinachytrium mesopotamicum (I14-15 vs Th14-15)**

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Olpidiales;f\_\_Olpidiaceae;g\_\_Olpidium;s\_\_  
\_Olpidium brassicae

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophlyctidales;f\_\_Rhizophlyctidaceae;  
g\_\_Rhizophlyctis;s\_\_Rhizophlyctis rosea

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Rhizophydiales;f\_\_Incertae  
sedis;g\_\_Operculomyces;s\_\_Operculomyces laminatus

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales;f\_\_Spizellomycetaceae;  
g\_\_Powellomyces;s\_\_Powellomyces sp

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales;f\_\_Spizellomycetaceae;  
g\_\_Spizellomyces;s\_\_Spizellomyces punctatus

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_Spizellomycetales;f\_\_Spizellomycetaceae;  
g\_\_Spizellomyces;s\_\_Spizellomyces sp

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_Chytridiomycetes;o\_\_unidentified;f\_\_unidentified;g\_\_unidenti  
ed;s\_\_Chytridiomycetes sp

k\_\_Fungi;p\_\_Chytridiomycota;c\_\_unidentified;o\_\_unidentified;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified;s\_\_  
\_Chytridiomycota sp

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Diversisporales;f\_\_Acaulosporaceae;g\_\_En  
trophospora;s\_\_Entrophospora sp

k\_\_Fungi;p\_\_Glomeromycota;c\_\_Glomeromycetes;o\_\_Glomerales;f\_\_Glomeraceae;g\_\_Glomus;s\_\_  
\_Glomus indicum

k\_\_Fungi;p\_\_Rozellomycota;c\_\_unidentified;o\_\_unidentified;f\_\_unidentified;g\_\_unidentified;s\_\_  
Rozellomycota sp

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae  
sedis;o\_\_Kickxellales;f\_\_Kickxellaceae;g\_\_Ramicandelaber;s\_\_Ramicandelaber sp HMH\_2010b

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae  
sedis;o\_\_Mortierellales;f\_\_Mortierellaceae;g\_\_Mortierella;s\_\_Mortierella ambigua

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae  
sedis;o\_\_Mortierellales;f\_\_Mortierellaceae;g\_\_Mortierella;s\_\_Mortierella elongatula

k\_\_Fungi;p\_\_Zygomycota;c\_\_Incertae  
sedis;o\_\_Mortierellales;f\_\_Mortierellaceae;g\_\_Mortierella;s\_\_Mortierella exigua

**Publicaciones científicas generadas a partir de este trabajo de Tesis:**

- **Ganuza, M.**, Pastor, N.A., Erazo, J.G., Andres, J.A., Reynoso, M.M., Rovera, M., Torres, A.M., 2018. Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut smut, an emergent disease caused by *Thecaphora frezii*. *European Journal of Plant Pathology*, 151:257–262.
- **Ganuza, M.**, Pastor, N., Bocolini, M., Erazo, J., Palacios, S., Oddino, C., Reynoso, M.M., Rovera, M. and Torres, A.M., 2019. Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils. *Journal of applied microbiology*, 126(2), pp.608-623.

# Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut smut, an emergent disease caused by *Thecaphora frezii*

M. Ganuza · N. Pastor · J. Erazo · J. Andrés ·  
M. M. Reynoso · M. Rovera · A. M. Torres

Accepted: 11 October 2017  
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2017

**Abstract** In this work, a bioformulation containing *Trichoderma harzianum* strain ITEM 3636, an effective biocontrol agent against the peanut pathogen *Fusarium solani*, was evaluated for control of peanut smut, an emergent disease caused by *Thecaphora frezii*. The performance of the bioformulation was evaluated during seasons 2014/2015 and 2015/2016 in experimental fields with history of peanut smut. Inoculation with *T. harzianum* ITEM 3636 significantly reduced the severity of peanut smut during both seasons by 17% and 25%, respectively. This is the first report where a consistent decrease of peanut smut symptoms is achieved in field experiments using a potential biological control agent. The identity of the causal agent of peanut smut was confirmed by sequencing the D1/D2 DNA region. *T. harzianum* ITEM 3636 caused significant increases in

grain weight/plant in both years. Peanut smut and brown root rot are diseases that cause severe economic losses. Both causal agents may be present in the soil and, depending on environmental factors, cause disease. The *T. harzianum* ITEM 3636 bioformulation has high potential for controlling both diseases. Thus, the application of a single bioformulation could protect the health of peanut plants against two high impact pathogens.

**Keywords** *Trichoderma harzianum* strain ITEM 3636 · *Thecaphora frezii* · Peanut seeds inoculation · Peanut smut management · Plant growth promotion

---

Ganuza, M. and Pastor, N. contributed equally to this work.

---

M. Ganuza · N. Pastor · J. Erazo · M. M. Reynoso ·  
M. Rovera · A. M. Torres (✉)  
Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de  
Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC, Ruta 36  
km. 601 (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina  
e-mail: atorres@exa.unrc.edu.ar

M. Ganuza  
UNRC- MINCyT, Córdoba, Argentina

N. Pastor · J. Erazo · M. M. Reynoso · A. M. Torres  
UNRC-CONICET, Córdoba, Argentina


J. Andrés  
Laboratorio de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía y  
Veterinaria, UNRC, Córdoba, Argentina

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of South America's originated oleaginous crops with high importance worldwide. Approximately 600,000 tons of peanut and peanut-derived products are exported to 88 countries, with annual incomes of nearly 800 million dollars. During the last years, peanut production has not only been increasing in yield but also in the quality of the harvested product since consumers tend to require high-quality products. Therefore, research and dissemination of technologies constitute essential elements for growing peanuts (Andrés et al. 2016).

Among the diseases affecting peanut plants, Marinelli et al. (2010) reported the presence of peanut smut in samples from the northern-central region of Córdoba, Argentina. The causal fungus, *Thecaphora frezii*, had been identified by Carranza and Lindquist in Carranza and Lindquist (1962) from infected wild peanut (*Arachis* sp.) from Brazil. The production losses

## ORIGINAL ARTICLE

# Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils

M. Ganuza<sup>1,2,\*</sup>, N. Pastor<sup>1,2,\*</sup>, M. Boccolini<sup>3</sup>, J. Erazo<sup>1,2</sup>, S. Palacios<sup>1,2</sup>, C. Oddino<sup>4</sup>, M.M. Reynoso<sup>1,2</sup>, M. Rovera<sup>1</sup> and A.M. Torres<sup>1,2</sup> 

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

2 UNRC-CONICET, Río Cuarto, Argentina

3 INTA EEA - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Marcos Juárez, Marcos Juárez, Córdoba, Argentina

4 Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

## Keywords

biocontrol, denaturing gradient gel electrophoresis, metagenomics, microbial structure, soil.

## Correspondence

Adriana Torres, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.  
E-mail: atorres@exa.unrc.edu.ar

\*These authors contributed equally to this work.

2018/1550: received 10 August 2018, revised 9 October 2018 and accepted 22 October 2018

doi:10.1111/jam.14147

## Abstract

**Aim:** To investigate the impact of inoculating peanut seeds with the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on the structure of bacterial and fungal communities from agricultural soils.

**Methods and Results:** Polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and next-generation sequencing (NGS) of amplicons (or marker gene amplification metagenomics) were performed to investigate potential changes in the structure of microbial communities from fields located in a peanut-producing area in the province of Córdoba, Argentina. Fields had history of peanut smut (caused by *Thecaphora frezii*) incidence. The Shannon indexes ( $H'$ ), which estimate diversity, obtained from the PCR-DGGE assays did not show significant differences neither for bacterial nor for fungal communities between control and inoculation treatments. On the other hand, the number of operational taxonomic units obtained after NGS was similar between all the analysed samples. Moreover, results of alpha and beta diversity showed that there were no significant variations between the relative abundances of the most representative bacterial and fungal phyla and genera, in both fields.

**Conclusions:** *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 decreases the incidence and severity of agriculturally relevant diseases without causing significant changes in the microbial communities of agricultural soils.

**Significance and Impact of the Study:** Our investigations provide information on the structure of bacterial and fungal communities in peanut-producing fields after inoculation of seeds with a biocontrol agent.

## Introduction

In Argentina, between 350 and 400 thousand hectares are planted annually with peanuts (*Arachis hypogaea* L.), approximately 90% of which are sown in the province of Córdoba. The average yield varies between 3.3 and 3.5 tons of peanuts per hectare, which represents around one million tons per year. Argentina is the main country exporting high quality peanuts or confectionery quality

peanuts, although its production represents <2% of the world's production (Pedelini 2014). Peanut plants are susceptible to a large number of diseases that develop due to numerous factors such as the susceptibility of the cultivar to diseases, type of pathogen (fungi, bacteria or viruses), a favourable environment and biotic factors (including the microbiota associated to the plant). Such factors are part of the tetrahedron of the disease described by Brader *et al.* (2017). Within a favourable environment,