

El mundo de las comunidades microbianas de las plantas y la aplicación de las nuevas herramientas de secuenciación de ADN para su estudio

The world of plant microbial communities and the application of new DNA sequencing tools for their study

Autores:

Caamal-Chan María Goretty¹, Barraza Aarón¹
y Loera-Muro Abraham^{1*}

Resumen

Las plantas juegan un papel clave para los ecosistemas y para la vida en el planeta. A pesar de ser organismos sésiles, enfrentan los diferentes retos que su entorno les ofrece. Una de las estrategias utilizadas para ello, ha sido el desarrollo de interacciones con los microorganismos que las rodean, logrando de esta forma relaciones únicas y benéficas para ambos. Sin embargo, a pesar de la importancia que tienen estas comunidades microbianas para la salud de las plantas, de los ecosistemas donde ellas habitan, y en general, para la vida en la Tierra, es poco lo que se conoce a cerca de ellas, de como interaccionan unas con otras, y con la planta que habitan. Actualmente, los investigadores han enfocado su atención en su estudio para entender sus relaciones y funciones, buscando poder aprovecharlas en beneficio del ser humano y del cuidado del ambiente. Para esto, alguna de las técnicas actualmente más aplicadas son las nuevas herramientas de secuenciación de ADN, conocidas como “Secuenciación de Nueva Generación”, que permiten la generación de una gran cantidad de datos que ayudan a los investigadores en el estudio de estas comunidades microbianas y en sus interacciones con las plantas. En esta revisión trataremos de describir la importancia de estas comunidades, las interacciones que tienen con las plantas que ellas habitan, los beneficios que les proporcionan y las diferentes técnicas de secuenciación de nueva generación que se utilizan para su estudio.

Palabras clave.

Comunidades microbianas, microbioma, interacción planta-microorganismo.

¹CONACYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S. C.P. 23096, México.

*Author for correspondence: aloera@cibnor.mx.

Abstract

Plants play a key role for ecosystems and for life on the planet. Despite being sessile organisms, they face the different challenges that their environment offers them. One of these strategies has been the development of interactions with the microorganisms that surround them, thus achieving unique and beneficial relationships for both. However, despite the importance of these microbial communities for the health of plants, the ecosystems where they inhabit, and in general, for life on Earth, little is known about them. Currently, researchers have focused their attention in their study to understand their relationships and functions, seeking to take advantage of them for the benefit of the human being and the care of the environment. For this, the new DNA sequencing tools, known as “New-Generation Sequencing” (NGS) techniques have been applied, which allow the generation of a large amount of data that helps researchers in the study of these microbial communities and in their interactions with plants. In this review, we will try to describe the importance of these communities, the interactions they have with the plants that they inhabit, the benefits they provide, and the different Next-Generation Sequencing techniques used for their study.

Key words. Microbial communities, microbiome, plant-microorganism interaction.

Antecedentes

Las plantas son muy diversas y ocupan la mayor parte de la tierra, donde juegan un papel clave como productores en las redes tróficas (cadena alimentaria). A pesar de ser organismos que no poseen algún medio de auto-locomoción, ya que son organismos sésiles, afrontan los retos del entorno, como por ejemplo: el

cambio climático, los suelos salinos, la sequía (estos tres anteriores son llamados como estrés abiótico), y los agentes patógenos (conocidos como estrés biótico). Una de las estrategias para contrarrestar los diferentes tipos de estrés, es la interacción con microorganismos y establecer una relación estrecha con el propósito de protección (Delaux, 2015; Gopal y Gupta, 2016). La relación de las plantas con los microorganismos ha sido larga a través de su historia evolutiva. Actualmente se postula que el éxito de las plantas para migrar de un ambiente acuático a la tierra fue gracias a su capacidad de asociarse con microorganismos (Cuadro 1) (Margulis, 1982; Delaux, 2015; Delwiche y Cooper, 2015).

Las plantas, albergan muchos microorganismos en una relación altamente regulada y específica conocida como el microbioma de la planta, el cual es diverso y dinámico. El microbioma o en

el caso de las plantas también llamado fitomicrobioma o fitobioma, está compuesto de microorganismos procariotas (células que carecen de organelos del tipo de la mitocondria, cloroplastos y undilopodia) y eucariotas (que poseen la región nuclear rodeada por una membrana y organelos antes mencionados), incluyendo bacterias, arqueas, virus, hongos y protozoos, que tiene funciones importantes comparables a los beneficios que aporta la microbiota humana a la salud, por ejemplo, en el metabolismo, la nutrición, la fisiología y la inmunidad. La composición del microbioma también es muy variable según la especie vegetal, etapa de desarrollo, genotipo (constitución genética completa de un individuo), etc.

Por ejemplo, las comunidades microbianas que las raíces reclutan de una reserva microbiana o microbioma del suelo dado pueden variar entre los genotipos de plantas y, de hecho, cada genotipo de

planta se relaciona con una gama central de socios microbianos (Lemanceau *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Simbiosis: La simbiosis es una

relación que se establece entre dos organismos que se necesitan mutuamente para sobrevivir. La mayoría de las plantas pueden establecer asociaciones simbióticas con microorganismos que ayudan a las plantas a adquirir nutrientes (especialmente fosfato y nitrógeno) y también ayudan a protegerlas de diversos estreses bióticos y abióticos. El ejemplo clásico es el de las leguminosas, como el frijol, que son reclutadores particularmente activos de “amigos”, ya que han establecido interacciones muy sofisticadas y beneficiosas con bacterias fijadoras de nitrógeno (Venkateshwaran *et al.*, 2013).

El suelo y el aire: ambientes ideales para el reclutamiento del microbioma de una planta.

Décadas de investigación han permitido saber que las plantas reclutan activamente sus microorganismos de los reservorios con los que tienen contacto. En el caso de la raíz, el ambiente reservorio es el suelo formando la microbiota de la rizósfera. La rizósfera es una capa de suelo circundante y firmemente adherida a las raíces que está influenciada por los nutrientes derivados de las plantas y la disponibilidad de oxígeno (Müller *et al.*, 2016).

En el caso de los tejidos aéreos de la planta, como las hojas o flores, el ambiente es el aire para formar la microbiota de la filósfera (todos los órganos de las plantas que se encuentran por encima del suelo, dominados por las hojas, pero que también incluyen tallos, flores y frutos) (Müller *et al.*, 2016; Compant *et al.*, 2019). A la forma de adquirir microorganismos del ambiente por parte de un hospedero (en este caso las plantas), se le



conoce como transmisión microbiana horizontal. Sin embargo, no es la única forma en la que una planta adquiere los microorganismos que conforman su microbioma.

También la puede adquirir por herencia por parte de los padres, es decir, de generación en generación vía semillas conocido como transmisión microbiana vertical (Frank *et al.*, 2017). Por todo lo anterior, el microbioma de la planta está compartimentado para su estudio en la rizósfera (región cercana a las raíces), la endósfera o endofíticas (región dentro de las raíces y tejidos vegetales), y la filósfera (las superficies aéreas de las plantas, incluidas las hojas, frutos, etc.).

Los estudios de la microbiota de la rizósfera han tenido grandes avances debido a su importancia ecológica. Actualmente, se sabe que si bien el suelo es el banco de diversidad microbiana del que la raíz de una planta obtiene su microbioma para satisfacer sus necesidades, no

todos los microorganismo pueden integrarlo. La planta tiene un lenguaje específico para atraer a los microorganismos de forma selectiva y solo aquellas poblaciones de microorganismos que cuenten con ese lenguaje podrá interaccionar con la planta sin ser rechazado agresivamente. Por otro lado, los microorganismo que conforman el microbioma se encuentran interaccionando entre ellos, por lo que los mecanismos de comunicación entre los microorganismos también son de gran importancia. Dicho en otras palabras, se requieren múltiples interacciones entre planta-microorganismo y microorganismo-microorganismo para el ensamble del microbioma de una planta. El microbioma central se establece y enriquece seleccionando los taxones (identidad del microorganismo) microbianos de gran importancia para el hospedero (Gopal and Gupal 2016; Mitter *et al.*, 2019).

Ensamblaje de la comunidad microbiana: del suelo a la planta.

La gran pregunta que surgió en la comunidad científica desde hace décadas fue ¿cómo la planta selecciona a los miembros del microbioma? La planta interactúa con el microbioma del suelo a través de la liberación de sustancias conocidas como exudados de raíces; que contiene una variedad de compuestos, principalmente ácidos orgánicos, azúcares y metabolitos secundarios. La composición de los exudados puede variar entre especie de plantas, edad y el ambiente. Por otro lado, el microbioma influye en los exudados de las raíces, ya que se ha observado que las plantas en condiciones axénicas (ambiente donde no hay ningún microorganismo), tienen una composición diferente de aquellas influenciados por microbios (Hu *et al.*, 2018).

Se ha observado que solo algunos microorganismos del suelo tienen el potencial genómico para detectar, degradar, metabolizar y utilizar distintos compuestos del exudado de la raíz. En este punto, se tiene una densidad grande de microorganismos que emplean a los exudados de la raíz, sin embargo, no todos

llevan una buena relación. Comienza una competencia por los componentes del exudado presentes en el suelo creando una interacción microorganismo-microorganismos en donde la presencia de toxinas y componentes con actividad antimicrobiana son secretadas para eliminarse unos a otros. Los aliados en esta interacción poseen diferentes códigos de comunicación. Uno de los más importantes, es el llamado sistema de señalización “Quorum sensing” (QS) y los sistema de dos componentes, que son como códigos para no matar a la comunidad aliada. Los microorganismo sobrevivientes entran a una segunda etapa, se mueven hacia las plantas a través del fenómeno conocido como quimiotaxis (movimiento de los microorganismos de acuerdo a la concentración de las sustancias químicas del exudado en el suelo), que involucran diferentes proteínas, como las de motilidad y el ensamblaje de flagelos

bacterianos (Trivedi *et al.*, 2020). En esta segunda etapa, los microorganismos que constituyen la microbiota de la rizósfera se encuentran en la superficie de la raíz en donde comienzan la formación de unos agregados bacterianos conocidos como biopelículas (Loera Muro *et al.*, 2019).

A continuación, parte de los microorganismos que forman la microbiota de la rizósfera, colonizan la parte interna de la planta, formando la futura microbiota interna o la microbiota endófito (microorganismos que habitan dentro de la planta).

Esta colonización está mediada por comunicaciones sofisticadas entre plantas y microorganismos. Los microorganismos que forman la microbiota de la rizósfera y la endófito deben poseer moléculas que son reconocidas por las plantas como un sistema de reconocimiento de entrada a la célula vegetal para no ser confundidas con un microorganismo patógeno (son aquellos que causan alguna enfermedad). Este sistema de reconocimiento es de suma importancia debido a que la planta tiene mecanismos de defensas (potentes mecanismos de señalización) activados por los microorganismos, los cuales detienen su entrada (Caamal *et al.*, 2020). Sin embargo, estos mecanismos pueden ser contrarrestados si el microorganismo posee la capacidad de bloquearlos e identificarse como benéfico. El pasaporte de los microorganismo de la microbiota lo han adquirido debido a años de evolución con la planta hospedera, lo que les permiten contrarrestar como primera parte los mecanismos de defensa dirigido a patógenos y como segundo punto activar los mecanismos que benefician la colonización exitosa del hospedero para conformar su microbiota (Lemanceau *et al.*, 2017). En este punto, aun falta mucho por descubrir sobre los mecanismos de adentramientos de los microorganismos benéficos, ya que algunos son similares a los de los patógenos.

Los complejos mecanismos de colonización de los miembros del microbioma de plantas.

La planta tiene contacto con microorganismos benéficos y patógenos, la diferencia es que los microorganismos benéficos aprovechan los recursos de la planta pero le otorgan un servicio positivo (facilitan la toma de nutrientes, activación de mecanismos contra microorganismos patógenos o contra la salinidad, sequia, entre otros), mientras que los patógenos solo toman los recursos para cumplir su ciclo de vida incluso llevando a la muerte a la planta. Los estudios indican que el sistema de defensa de las plantas juega un papel activo en la composición del microbioma. Las plantas pueden reconocer (debido a unas antenas localizadas en la superficie conocidas como receptores PRR, del inglés “pattern recognition receptor”) a los microorganismos debido a sus componentes estructurales conocidos como patrones moleculares asociados a microorganismo (microbe-associated molecular patterns o “MAMPs”) para activar los mecanismos de defensa. Estos MAMPs no son diferentes entre los microorganismos benéficos o los patógenos. Entonces, ¿cómo hace la planta para identificar uno de otro?, se sabe que en la composición de los MAMPs (secuencia peptídica) de diferentes organismos existen pequeñas diferencias (una divergencia de las MAMPs). Esta estrategia permite que la planta reconozca al microorganismos entrante como benéfico y se desactiven los mecanismos de defensa, permitiendo que se forme conjuntos microbianos. Por otro lado, se sabe que para entrar al tejido vegetal los microorganismos producen enzimas líticas como lisozimas para degradar la pared celular. Sin embargo, se postula que comunidades endófitas producen bajos niveles de estas enzimas en comparación con los patógenos (Yu *et al.*, 2019).

Al igual que las bacterias patógenas, los microorganismo de la microbiota endofítica tienen un mecanismo para inyectar en

la célula vegetal proteínas que benefician la colonización (proteínas efectoras), el cual es conocido como sistema de secreción tipo 3 (T3SS).

Antiguamente se creía que estas proteínas estaban ausentes o presentes en cantidades bajas en las bacterias endofíticas. Sin embargo, las herramientas como las nuevas técnicas secuenciación masiva de ADN (técnicas de secuenciación de nueva generación o NGS) han permitido generar el conocimiento de muchos genes que codifican estas proteínas efectoras presentes en las bacterias benéficas, y que activan mecanismos de defensa en la planta durante la colonización de la raíz (Loper *et al.*, 2012; Stringlis *et al.*, 2018 y 2019). Además, secuencias de los microbiomas de las raíces de las plantas de importancia agrícola presentan un enriquecimiento significativo de genes T3SS a nivel comunitario que están posiblemente involucrados en la supresión de las respuestas

de defensa de la raíz (Ofek *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2019). Estos múltiples mecanismos son el pasaporte de la microbiota de la planta.

Interacciones dentro de las comunidades microbianas y con las plantas que habitan.

Las teorías ecológicas sugieren que en el microbioma de las plantas existen interacciones complejas entre el hospedero, los microorganismos y el medio ambiente. Los estudios de asociación de los genomas han demostrado que las plantas influyen en la composición del microbioma. Así mismo, se ha observado que la intensificación de la agricultura disminuye la conectividad de estas redes, así como, la abundancia de los grupos de microorganismos clave, lo que sugiere que los sistemas de cultivo intensivo son menos resistentes a las tensiones ambientales que los manejados por prácticas de baja intensidad como la agricultura orgánica. Dada la diversidad de microorganismos que colonizan las plantas, un enfoque emergente en el campo de los microbiomas que habitan las plantas es el papel de las interacciones entre múltiples reinos dentro de las comunidades microbianas (Trivedi *et al.*, 2020).

Existen un gran número de mecanismos por los cuales las plantas pueden interactuar con su microbioma (de Souza *et al.*, 2015). Estas interacciones están influenciadas por factores tanto del huésped, de los microorganismo, y también por factores ambientales, como la composición del suelo, la temperatura, la humedad, la irradiación, entre otros (Leach *et al.*, 2017). Así mismo, como ya se describió anteriormente, el ensamblaje de un microbioma asociado a una planta es un proceso de varios pasos que está determinado por la dispersión, las interacciones de las especies, el medio ambiente y el huésped (Trivedi *et al.*, 2020).

Para establecer estas interacciones entre los microorganismos y sus plantas hospederas, algunas barreras físicas y defensas del

sistema inmune deben ser evadidas mediante una efectiva comunicación entre la planta y los microorganismos, a través de diferentes mecanismos moleculares (Mhlongo *et al.*, 2018).

Los microorganismos asociados a las plantas utilizan la quimiotaxis para detectar y responder a señales derivadas de las plantas, como ácidos orgánicos y/o azúcares presentes en los exudados de las mismas, y posteriormente iniciar la colonización. Una vez que se percibe una señal, los microorganismos se mueven hacia la planta principalmente mediante el uso de estructuras celulares llamadas flagelos. A continuación, los microorganismos se adhieren a la superficie de la raíz y forman unas estructuras conocidas como biopelículas.

En este punto, existen muchas moléculas, como las poliaminas (ejemplo, la arginina y la putrescina), que funcionan como moléculas de señalización en la interfaz raíz-rizósfera e informan al



microbioma de la presencia de una planta (Trivedi *et al.*, 2020). Por otro lado, la percepción extracelular en las plantas está mediada típicamente por los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR), mencionados anteriormente, que se encuentran unidos a la membrana plasmática y sirven para detectar ciertas moléculas conservadas en los microorganismos, las MAMPs.

La activación de un PRR por un MAMP asociado produce una respuesta de defensa de la planta, denominada colectivamente inmunidad activada por MAMP (MAMP-Triggered Immunity o MTI), que limitan el crecimiento de ciertos microorganismos, como los patógenos (Garrido-Oter *et al.*, 2018). La MTI funciona en el reconocimiento de muchos componentes del microbioma de las plantas, incluidas las bacterias, hongos, oomicetos, nematodos e insectos. Por otra parte, también existen los llamados patrones moleculares asociados a daños (Damage-

Associated Molecular Patterns o DAMP), que son por definición, moléculas propias de las plantas, pero que su presencia señala la actividad dañina en las mismas por otros organismos. La percepción de DAMP también se lleva a cabo mediante los PRR (Leach *et al.*, 2017).

La evasión o supresión del sistema inmunológico de las plantas no solo es esencial para que los patógenos puedan infectar con éxito a su hospedante, sino que también es fundamental para que los comensales colonicen diferentes nichos de las plantas (Trivedi *et al.*, 2020). Para evitar estos mecanismos de reconocimiento del sistema inmune de las plantas, los microorganismos secretan moléculas conocidas como efectores, que son moléculas expresadas que cambian la fisiología del huésped para beneficiar al invasor (Jones *et al.*, 2016). Dentro de estos efectores, pueden existir pequeños fragmentos (dominios) asociados a las plantas y asociados a las raíces (del inglés Plant-Resembling Plant-Associated and Root-Associated Domains o PREPARADOS), muy abundantes en los genomas de las bacterias asociadas a las plantas y que representan una estrategia de “camuflaje” para evadir la inmunidad al unirse a moléculas de MAMP extracelulares y funcionar como una capa de invisibilidad molecular (Trivedi *et al.*, 2020). Sin embargo, la planta también puede percibir la existencia de estos efectores gracias a proteínas llamadas en general LRR (Leucine-Rich Repeat) de unión a nucleótidos (Nucleotide-binding LRR proteins o NLR). Estas proteínas NLR han evolucionado para detectar la presencia o actividad de proteínas efectoras, que conducen a la activación de fuertes reacciones inmunes, conocida como inmunidad activada por efectores (Effector-Triggered Immunity o ETI) (Teixeira *et al.*, 2019).

Por otra parte, algo muy interesante de tomar en cuenta es que la mayoría de los microorganismos pertenecientes al microbioma de las plantas no son patógenos. Sin embargo, muchos de

ellos expresan moléculas que son potencialmente reconocidas por el sistema inmune de la planta. Así pues, ¿cómo el sistema inmune de la planta distingue a los microorganismos amigos de los patógenos para ensamblar su microbioma?. Una de las formas que se ha visto hasta el momento es, que al igual que los patógenos, varios microorganismos no patógenos poseen la capacidad de suprimir la reacción inmune de las plantas a través de varias maneras: i) cambiando los MAMP, ii) degradando o secuestrando los MAMP, y iii) modificando los MAMP (Teixeira *et al.*, 2019).

Así mismo, para establecer una relación simbiótica con las plantas, algunas bacterias del microbioma secretan o emiten moléculas beneficiosas para la planta (como por ejemplo: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido absólico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)), desencadenando cambios en la expresión de los genes

de la planta (Fahad *et al.*, 2015). Todos estos compuestos están involucrados en el mantenimiento de la salud del suelo, la modulación del crecimiento de las plantas y la inducción de resistencia hacia diferentes factores, tanto bióticos como abióticos (Mhlongo *et al.*, 2018).

Por su parte, las plantas sirven como fuentes ricas de nutrientes para diferentes microorganismos que viven dentro y alrededor de sus tejidos. A través del proceso denominado rizodeposición (dado por los exudados de la raíz), las plantas liberan compuestos orgánicos en el suelo, como carbohidratos, entre otros, que contribuyen a la acumulación del carbono derivado de plantas a la biomasa microbiana circundante (Pausch y Kuzyakov, 2018). Un ejemplo de estos exudados son los flavonoides, que son metabolitos secundarios ricos en carbono. La adaptación bacteriana a los exudados de las raíces de las plantas es claramente visible en todos los niveles, desde el genoma hasta el metaboloma de los microorganismos que conforman el microbioma de las plantas (Levy *et al.*, 2018).

Finalmente, para que exista un correcto ensamblaje de las comunidades microbianas que forman el microbioma de las plantas, además de la comunicación que debe existir entre los microorganismos que la habitan con su huésped, también deben existir interacciones microorganismo-microorganismo.

Los genomas de muchas bacterias asociadas a plantas codifican mecanismos de destrucción de bacterias interespecíficos (contra su misma especie) e intraespecíficos (contra otras especies) por ejemplo, la producción de antibióticos, a través de los cuales pueden modular la distribución, abundancia y diversidad de otros grupos microbianos dentro de la planta hospedera. Así mismo, también los genes relacionados con la resistencia a estas moléculas biocidas se enriquecen en el entorno vegetal, lo que sugiere una intensa carrera de armas microbianas que controla la estructura de la comunidad

microbiana (Trivedi *et al.*, 2020).

Uno de los principales mecanismos a través de los cuales ocurren estas interacciones es a través del ya mencionado “quorum sensing” (QS). El proceso de QS involucra a la célula bacteriana que produce señales químicas conocidas como autoinductores (AI), que se secretan en el espacio extracelular (fuera de la célula del microorganismo).

Hasta la fecha, tres tipos de autoinductores se han caracterizado en bacterias: AI-1, AI-2 y AI-3. El AI-1 está involucrado generalmente en la comunicación dentro de la misma especie. El AI-2 está involucrado en la comunicación entre diferentes especies bacterianas (Whiteley *et al.*, 2017). Finalmente, el AI-3, se encuentra involucrado en la comunicación entre especies de diferentes reinos, por ejemplo entre las bacterias con su hospedero. Diferentes taxones bacterianos pueden generar el mismo tipo de molécula de señalización, lo que permite la cooperación

o la interferencia (quorum quenching) con otros taxones no relacionados. Además, el QS también tienen un papel en las interacciones entre reinos.

La percepción de los AI por parte de las plantas conduce a la modulación del metabolismo de la planta, la respuesta inmune y el desarrollo de las raíces (Trivedi *et al.*, 2020).

Finalmente, las plantas generalmente seleccionan un microbioma que promueve la resistencia al estrés en condiciones de estrés abiótico o biótico. Las plantas en condiciones adversas pueden depender de cambios en el microbioma asociado.

Probablemente mediante una combinación de efectos directos del microbioma sobre la fisiología vegetal y efectos indirectos mediados por la disponibilidad de nutrientes del suelo (Trivedi *et al.*, 2020).

Las nuevas técnicas de secuenciación de ADN: Secuenciación de Nueva Generación (Next-Generation Sequencing o NGS).

Las tecnologías de secuenciación de ADN ayudan a los investigadores en una amplia gama de aplicaciones, como la clonación molecular, la reproducción, la búsqueda de genes de diferentes patógenos, en estudios comparativos y de evolución, entre muchos otros. Idealmente, las tecnologías de secuenciación de ADN deben ser rápidas, precisas, fáciles de operar y económicas. En los últimos treinta años, las tecnologías y aplicaciones de secuenciación de ADN han experimentado un tremendo desarrollo y actúan como el motor de la era del genoma, que se caracteriza por una gran cantidad de datos de diferentes genomas y, posteriormente, una amplia gama de áreas de investigación y múltiples aplicaciones (Liu *et al.*, 2012). El término Secuenciación de Nueva Generación (Next-Generation Sequencing o NGS) tiene casi una década que se comenzó a utilizar, pero sigue siendo la forma coloquial de describir métodos de secuenciación altamente paralelos y de alto rendimiento

que producen datos en o más allá de la escala del genoma (conjunto completo de ADN en un organismo) (Levy y Myers, 2016). Las tecnologías de NGS son diferentes de los métodos tradicionales de secuenciación (como el llamado Sanger), en aspectos como el análisis de datos masivos, altos rendimientos y costos reducidos. Aunque las NGS hacen que las secuencias del genoma sean en cierto modo fáciles de obtener, el análisis de estos datos y las explicaciones biológicas que le siguen a esto siguen siendo el cuello de botella en la comprensión de los genomas (Liu *et al.*, 2012). Con más y más organismos secuenciados, una avalancha de datos genéticos inunda el mundo todos los días.

El progreso en la genómica ha avanzado constantemente debido a una revolución en la tecnología de secuenciación gracias a las NGS. Además, las NGS permiten realizar otros tipos de estudios a gran escala, como exómica, metagenómica, epigenómica y transcriptómica, entre otros. Estos estudios no solo proporcionan el conocimiento para la investigación básica, sino que también brindan beneficios de aplicación inmediata. Los científicos de muchos campos están utilizando estos datos para el desarrollo de cultivos, mejoras en los rendimientos de los cultivos, ganado más prósperos y mejores diagnósticos, pronósticos y terapias para el cáncer y otras enfermedades complejas, entre muchísimas más aplicaciones que se les da (Liu *et al.*, 2012). En la siguiente sección, describiremos cuales son y los principales usos que se les da a las NGS en el campo del estudio de las comunidades microbianas que habitan las plantas (Figura 1).

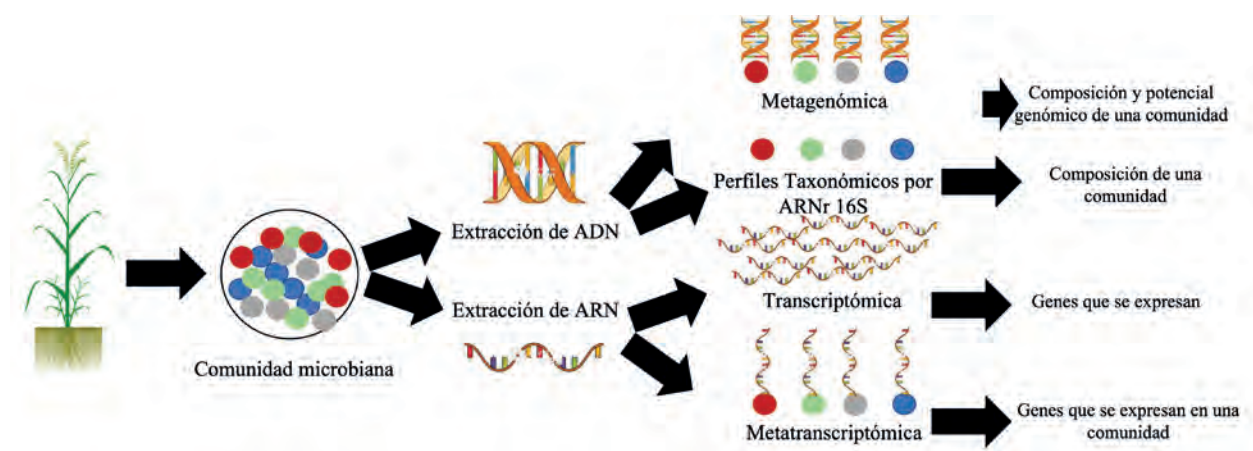


Figura 1. Esquema general de como son los análisis de perfiles taxonómicos por secuenciación del 16S ARNr, metagenómica, transcriptómica y metatranscriptómica para el estudio de las comunidades microbianas, tanto de plantas, como de cualquier otro hospedero o ambiente.



Discusión Académica

Estudios de perfiles taxonómicos por secuenciación del gen que codifica para el 16S ARNr y la región intergénica, ITS.

En ecología microbiana, la investigación se ha visto obstaculizada porque la mayoría de los microorganismos ambientales no son cultivables, debido a que regularmente, en la naturaleza, las comunidades microbianas son increíblemente complejas y diversas. Una gran cantidad de estudios en diversos entornos naturales han identificado muchos grupos microbianos sin cultivo.

Para superar esta dificultad técnica, se han utilizado diferentes enfoques independientes del cultivo de microorganismos, donde podemos incluir a la hibridación de ADN (por ejemplo, hibridación *in situ* fluorescente), la clonación de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, ver Cuadro 2) para detectar miembros específicos y/o genes funcionales en comunidades microbianas.

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación han popularizado recientemente métodos de secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr) y de amplicones metagenómicos (Shotgun metagenomics), que identifican miembros y/o genes funcionales a mayor escala y con más detalle (Hiraoka *et al.*, 2016). El análisis de la secuencia de amplicones de genes marcadores, típicamente el 16S ARNr en el caso de las bacterias, nos permite caracterizar la abundancia relativa de diferentes especies en las comunidades que forman el microbioma de las plantas (Mauchline y Malone, 2017).

El 16S ARNr es adecuado para este propósito por varias razones. El gen se distribuye universalmente, lo que permite el análisis de las relaciones filogenéticas entre taxones distantes (microorganismos diferentes). Como una parte funcionalmente indispensable del conjunto de genes centrales, se espera que el gen del 16S ARNr se vea afectado solo débilmente por la transferencia horizontal de genes (proceso por el cual una bacteria u otro tipo de célula es capaz de pasar un trozo del

genoma a otra, y esta segunda lo incorpora como suyo), lo que respalda aún más su uso para estos estudios. A pesar de lo anterior, el ARNr 16S todavía está sujeto a variación, especialmente en ciertas regiones variables. Si bien, la presencia de regiones variables permite una diversificación suficiente para proporcionar una herramienta para la clasificación, la presencia de regiones conservadas permite el diseño de cebadores (secuencias cortas de ADN de cadena simple que se utilizan para la PCR), adecuados o sondas de hibridación para varios taxones en diferentes niveles taxonómicos que van desde cepas individuales hasta phylum completos. A pesar del amplio uso del ARNr 16S, hay varios aspectos que limitan la interpretación de los resultados derivados de esta técnica. El más importante es el hecho de que su número de copias por genoma puede variar desde 1 hasta 15 o más copias (Vetrovsky y Baldrian, 2013).

Finalmente, los microorganismos del suelo y los que habitan en las plantas llevan a cabo procesos importantes, incluido el apoyo al crecimiento de las plantas, el ciclo del carbono y otros nutrientes, entre otros.

Sin embargo, la mayoría de estos microorganismos aún no han sido aislados y sus funciones se desconocen en gran medida. Aunque el uso de perfiles taxonómicos mediante el 16S ARNr revela identidades microbianas y hasta cierto punto, información genética funcional, incluye ADN de microbios con estados fisiológicos muy variables. Por lo tanto, esta técnica solo nos dice la composición de una comunidad de microorganismos en un momento específico y hasta cierto punto, predice el potencial funcional de esa comunidad (Jansson y Hofmockel, 2018).

Cuadro 2. Reacción en Cadena de la

Polimerasa o PCR: La PCR ha sido la principal

herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido a su adaptabilidad y aplicabilidad. Su uso abarca desde la detección de agentes patógenos, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, amplificación y modificación de fragmentos de ADN, análisis de especímenes ambientales y de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad, mapeo de rasgos hereditarios hasta estudios de expresión del gen, entre otros más. La PCR se basa en la amplificación de una región específica del genoma de interés mediante la utilización de cebadores específicos (secuencias cortas de ADN específicas para la región a obtener), la ayuda de una enzima involucrada en la replicación del ADN, la ADN polimerasa, y los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's), que son los ladrillos para la construcción de las nuevas cadenas de ADN (Bolívar *et al.*, 2014).

Estudios de Metagenómica o Shotgun Metagenómica.

La Metagenómica, Shotgun Metagenómica o la secuenciación del ADN total para metagenómica, es la secuenciación del ADN total de los genomas de los organismos que se encuentren en un sitio o ambiente determinado, incluido el ADN cromosómico completo, plásmidos, transposonones, etc., en un solo momento y su alineación *de novo* o con secuencias de referencia (secuencias previamente conocidas y almacenadas en bases de datos) (Liu *et al.*, 2012). Diversas comunidades microbianas de bacterias, arqueas, virus y eucariotas unicelulares tienen papeles cruciales en el ambiente, la salud humana, y por supuesto, en las plantas.

Sin embargo, los microbios suelen ser difíciles de cultivar en el laboratorio, lo que puede confundir la catalogación de miembros y la comprensión de cómo funcionan las comunidades. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y un conjunto de procesos computacionales se han combinado con el método de Shotgun Metagenómica para transformar la microbiología y ayudar en el estudio de las comunidades microbianas y en cómo funcionan (Quince *et al.*, 2017). La metagenómica es la secuenciación no dirigida (“Shotgun”) de todos los genomas (“metagenoma”) microbianos presentes en una muestra. La secuenciación por metagenómica se puede utilizar para perfilar la composición taxonómica y el potencial funcional de las comunidades microbianas, y para recuperar secuencias de genomas completos de cualquier organismo, ya sea bacteria, arquea, virus o célula eucariota, que se encuentre en una muestra determinada (Quince *et al.*, 2017). Lo anterior permite a los investigadores en el caso del estudio de las comunidades que habitan las plantas, poder conocer todos los genomas presentes en una muestra en particular de todos los organismos que hay en ella, con sus respectivos genes, lo que ayuda a conocer que microorganismos habitan en ella (conocidos o nuevos), tener los genomas completos de estos con sus respectivos genes, y de esta forma, conocer las funciones que los diferentes microorganismos pueden tener en esta compleja red de interacciones entre las plantas y los microorganismos.

Estudios Transcriptómicos.

El transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de ARN, incluido el ARNm (mensajero), el ARNr (ribosomal), el ARNt (transferencia) y otros ARN no codificantes (como micro ARNs, entre otros) producidos en una célula o en una población de células. Estas pueden ser de la misma especie (“Transcriptoma”), o de diferentes especies (“Metatranscriptoma”) (Liu *et al.*, 2012). En los últimos años, la tecnología de secuenciación de nueva

generación se ha utilizado para estudiar el transcriptoma con resultados muy interesantes (Stark *et al.*, 2019). Los métodos de NGS permiten el estudio del transcriptoma de un organismo o una población de organismos en un momento determinado (Mutz *et al.*, 2013). Lo anterior, por ejemplo, permite conocer a los investigadores como una planta, un microorganismo o una comunidad de microorganismos responden ante alguna situación en particular, mediante el estudio de la expresión de los genes involucrados en la respuesta a este estímulo, mediante el estudio de los ARNs transcritos del individuo o de la población en cuestión. Lo anterior es muy útil para conocer cómo son las interacciones entre los microorganismos con las plantas, saber qué genes participan en determinado momento y ante determinada situación, y finalmente, las funciones que cada uno tiene en estas comunidades tan complejas que se forman en el microbioma de las plantas.

Consideraciones finales y perspectivas.

En la actualidad, hay muchas plataformas de secuenciación disponibles. Todas ellas utilizan en general, fragmentos cortos, denominados como lecturas, para investigar las secuencias del genoma o de los genomas (Figura 2) (Mutz *et al.*, 2013). Las plataformas actuales de mayor uso son las que pertenecen a las empresas Illumina (MiniSeq, MiSeq, HighSeq y NovaSeq), PacBio (Sequel Systems), Oxford Nanopore (Nanopore MinION), y Thermo Fisher (Ion Torrent). Cada una con sus ventajas y desventajas, dependiendo de la investigación que se desea llevar a cabo. En algunos casos, la combinación de algunas de ellas comienza a ser un método muy utilizado para aprovechar las ventajas de cada una, y minimizar las desventajas de las mismas, permitiendo mejores resultados que pueden ser aprovechados por los investigadores.

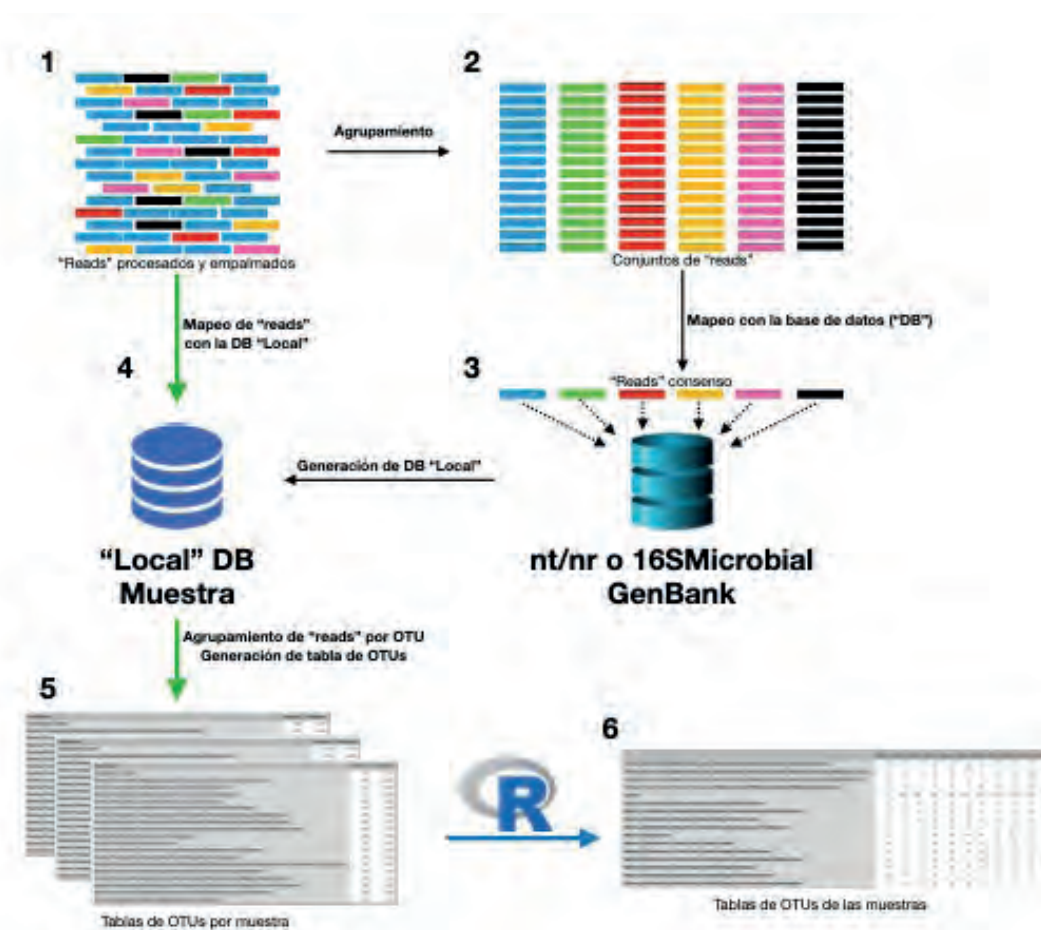


Figura 2. Esquema general de la forma en la que se procesan y generan las tablas de OTUs para los análisis de metagenómica de comunidades microbianas, tanto de plantas, como de cualquier otro hospedero o ambiente. 1) Conjunto de lecturas o "reads" procesados, pareados y empalmados. 2) Lecturas o "reads" agrupados con base al criterio de identidad/similitud del 98%. 3) Lecturas o "reads" consenso de cada agrupación que serán "mapeados" con la base de datos ("database" o "DB") del GenBank, para la generación de una DB "Local" o por muestra. 4) Mapeo del conjunto de "reads" procesados, pareados y empalmados de la muestra con la DB "Local" de la muestra. 5) Agrupamiento de las lecturas o de los "reads" por cada OTU y generación de la tabla de frecuencias de cada OTU en la muestra. 6) Integración de las tablas de OTUs por muestra a una tabla de OTUs de las muestras (Tomada del Capítulo 16, Metagenomas de Plantas, Loera-Muro *et al.*, en publicación).

El estudio del microbioma de las plantas permite a los investigadores poder desarrollar mejoras en los procesos de cultivos, como por ejemplo, mejores fertilizantes o biofertilizantes que no contaminen, aumentar la producción agrícola, cultivos más resistentes a las condiciones ambientales extremas y con mejores propiedades nutricionales. Lo anterior siempre en vías de lograr garantizar la producción de alimentos para las poblaciones, y que esta sea de una manera amigable con el ambiente. Sin embargo, y a pesar de los grandes avances en las tecnologías, como lo son las tecnologías de secuenciación de nueva generación, estamos apenas comenzando a entender a estas comunidades microbianas que habitan en las plantas, las interacciones y funciones que llevan a cabo, y su importancia para la salud de las mismas, de los ecosistemas, para el bienestar del ser humano, y de la vida en general.

Agradecimientos

El trabajo actual de investigación fue apoyado por CONACYT/México y por fondos proporcionados por el CIBNOR. Al DG. Gerardo Hernández García por la edición gráfica editorial.

Literatura citada

- Bolivar, A.M., Rojas, A., Garcia Lugo, P. 2014. *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. Avances en Biomedicina 3:25-33.
- Caamal-Chan, M.G., Loera-Muro, A., Barraza, A. 2020. *¿Las plantas también se enferman? Las defensas vegetales, una constante guerra contra los patógenos*. Recursos Naturales y Sociedad 6 (2): 01-12. doi:10.18846/renaysoc.2020.06.06.02.0001.
- Compant S., Samad A., Faist H., Sessitsch A. 2019. *A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application*. Journal of Advanced Research 19: 29-37. doi: 10.1016/j.jare.2019.03.004.
- Delaux, P.M., Radhakrishnan, G.V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M. Et al. 2015. *Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 112:13390-133395. doi:10.1073/pnas.1515426112
- Delwiche, C.F., Cooper, E.D. 2015. *The evolutionary origin a terrestrial flora*. Current Biology, 25:899-910. doi:10.1016/j.cub.2015.08.029.
- de Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. 2015. *Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils*. Genetics and Molecular Biology 38:401-419. doi:10.1590/S1415-475738420150053

- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D. 2015. *Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment*. Environmental Science and Pollution Research 22:4907-4921. doi:10.1007/s11356-014-3754-2
- Frank, A.C., Saldierna, J.P., Shay, J.E. 2017. *Transmission of bacterial endophytes*. Microorganisms 5:70. doi:10.3390/microorganisms5040070.
- Garrido-Oter, R., Nakano, R.T., Dombrowski, N., Ma, K.W., AgBiome Team, McHardy, A.C., Schulze-Lefert, P. 2018. *Modular traits of the rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia*. Cell Host Microbe 24:155-167.e5. doi:10.1016/j.chom.2018.06.006
- Gopal, M., Gupta, A. 2016. *Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies*. Frontiers in microbiology 7:1971. doi:10.3389/fmicb.2016.01971.
- Hiraoka, S., Yang, C.C., Iwasaki, W. 2016. *Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: Current status and beyond*. Microbes and Environment 31:204-212. doi:10.1264/jsme2.ME16024.
- Hu, L., Robert, C.A.M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., et al. 2018. *Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota*. Nature Communications 9:2738. doi:10.1038/s41467-018-05122-7.
- Jansson, J.K., Hofmockel, K.S. 2018. *The soil microbiome-from metagenomics to metaphenomics*. Current Opinion in Microbiology 43:162-168. doi:10.1016/j.mib.2018.01.013.
- Jones, J.D.G., Vance, R.E., Dangl, J.L. 2016. *Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals*. Science 354:1117-1125.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., Moëgne-Loccoz, Y. 2017. *Let the Core Microbiota Be Functional*. Trends Plant Science 22:583-595. doi:10.1016/j.tplants.2017.04.008.
- Leach, J.E., Triplett, L.R., Argueso, C.T., Trivedi, P. 2017. *Communication in the phytobiome*. Cell 169:587-596. doi:10.1016/j.cell.2017.04.025
- Levy, S.E., Myers, R.M. 2016. *Advancements in Next-Generation Sequencing*. Annual Review of Genomics and Human Genetics 17:95-115. doi:10.1146/annurev-genom-083115-022413.
- Levy, A., Conway, J.M., Dangl, J.L., Woyke, T. 2018. *Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome*. Cell Host Microbe 24:475-485. doi:10.1016/j.chom.2018.09.005
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012. *Comparison of next-generation sequencing systems*. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012:251364. doi:10.1155/2012/251364.
- Loera-Muro, A., Barraza, A., Caamal-Chan, M. G., 2019. *Diálogo entre bacterias ¿cómo se comunican las bacterias?*. Recursos Naturales y Sociedad 5(1): 24-39. doi:10.18846/renaysoc.2019.05.05.01.0003



- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Davis, E.W., Lim, C.K., et al. 2012. *Comparative genomics of plant-associated Pseudomonas spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions*. PloS Genet 8: e1002784. doi:10.1371/journal.pgen.1002784
- Margulis, L. 1982. *Early Life*. Science Books International, Inc. Boston, Mass, EUA. 160 pp.
- Mauchline, T.H., Malone, J.G. 2017. *Life in earth - the root microbiome to the rescue?*. Current Opinion in Microbiology 37:23-28. doi:10.1016/j.mib.2017.03.005.
- Mitter, B., Brader, G., Pfaffenbichler, N., Sessitsch, A. 2019. *Next generation microbiome applications for crop production limitations and the need of knowledge based solutions*. Current Opinion in Microbiology 49:59-66. doi:10.1016/j.mib.2019.10.006.
- Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N., Dubery, I.A. 2018. *The chemistry of plant-microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance*. Frontiers in Plant Science 9:112. doi:10.3389/fpls.2018.00112
- Müller, D.B., Vogel, C., Bai, Y., Vorholt, J.A. 2016. *The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives*. Annual Reviews of Genetics 50:211-234. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-034952.
- Mutz, K.O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J.G., Stahl, F. 2013. *Transcriptome analysis using next-generation sequencing*. Current Opinion in Biotechnology 24:22-30. doi:10.1016/j.copbio.2012.09.004.
- Ofek, M., Sela, N., Goldman, M., Green, S.J., Hadar, Y., Minz D. 2014. *Niche and host associated functional signatures of the root surface microbiome*. Nature Communications. doi:10.1038/ncomms5950.
- Pausch, J., Kuzyakov, Y. 2018. *Carbon input by roots into the soil: quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale*. Global Change Biology 24:1-12.
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J., Segata, N. 2017. *Shotgun metagenomics, from sampling to analysis*. Nature Biotechnology 35(9):833-844. doi:10.1038/nbt.3935.
- Stark, R., Grzelak, M., Hadfield, J. 2019. *RNA sequencing: the teenage years*. Nature Reviews Genetics 20(11):631-656. doi:10.1038/s41576-019-0150-2.
- Stringlis, I.A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M.C., Zamioudis, C., Pieterse, C. M.J. 2018. *Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists*. The Plant Journal 93: 166-180.
- Stringlis, I.A., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 2019. *Type III secretion system of beneficial rhizobacteria Pseudomonas simiae WCS417 and Pseudomonas defensor WCS374*. Frontiers in Microbiology, 10:1631. doi:10.3389/fmicb.2019.01631.

- Teixeira, P.J.P., Colaianni, N.R., Fitzpatrick, C.R., Dangl, J.L. 2019. *Beyond pathogens: Microbiota interactions with the plant immune system*. Current Opinion in Microbiology 49:7-17. doi:10.1016/j.mib.2019.08.003
- Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K. 2020. *Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health*. Nature Reviews Microbiology 18(11):607-621. doi:10.1038/s41579-020-0412-1.
- Venkateshwaran, M., Volkening, J.D., Sussman, M.R., Ané, J.M. 2013. *Symbiosis and the social network of higher plants*. Current Opinon in Plant Biology 16:118-27. doi: 10.1016/j.pbi.2012.11.007.
- Vetrovsky, T., Baldrian, P. 2013. *The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses*. PLoS ONE 8:e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923
- Whiteley, M., Diggle, S.P., Greenberg, E.P. 2018. *Progress in and promise of bacterial quorum sensing research*. Nature 555:126. doi:10.1038/nature25977
- Yu, K., Pieterse, C., Bakker, P., Berendsen, R. 2019. *Beneficial microbes going underground of root immunity*. Plant, Cell & Environment 42: 2860-2870. doi:10.1111/pce.13632.

CITA DE ARTÍCULO:

Caamal-Chan M. G., A. Barraza y A. Loera-Muro. 2022. El mundo de las comunidades microbianas de las plantas y la aplicación de las nuevas herramientas de secuenciación de ADN para su estudio. Recursos Naturales y Sociedad, 2022. Vol. 8 (1): 71-89. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2022.08.08.01.0005>

Sometido: 12 de junio de 2021

Revisado: 20 de agosto de 2021

Aceptado: 27 de octubre de 2021

Editor asociado: Dr. Alejandro López-Cortés.

Diseño gráfico editorial: Lic. Gerardo Hernández