

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Caracterización del microbioma endófito en hoja de banano y su  
variación en presencia de Sigatoka Negra (*Pseudocercospora  
fijiensis*) bajo manejo orgánico y convencional**

**Alejandra Karina Paladines Montero**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Caracterización del microbioma endófito en hoja de banano y su variación en presencia de Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) bajo manejo orgánico y convencional**

**Alejandra Karina Paladines Montero**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León, PhD**

Quito, 21 de diciembre de 2020

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Alejandra Karina Paladines Montero

Código: 00118466

Cédula de identidad: 0704302660

Lugar y fecha: Quito, 16 de diciembre de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

El patógeno sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) es el agente causal de la enfermedad foliar más devastadora en plantaciones de banano Cavendish (*Musa x paradisiaca*). Los microorganismos endófitos asociados a la herida del patógeno podrían presentar beneficios para la planta tales como antagonismo o promoción de la inmunidad vegetal. Además, cambios en la diversidad y estructura microbiana, dan una idea importante de la interacción entre el estado de la enfermedad y su microbioma asociado. Sin embargo, las variaciones microbianas, al entrar un patógeno en la filósfera de una planta, aún no están bien caracterizadas. Por ende, este estudio pretende caracterizar el microbioma bacteriano y fúngico de la hoja de banano en estado sano y enfermo evaluando manejo agronómico orgánico y convencional. Para esto se realizó una búsqueda sistemática de literatura donde se encontró que la diversidad del microbioma foliar varía dependiendo de la forma de vida del patógeno. Por otro lado, se recolectó muestras de hojas de banano sanas e infectadas con sigatoka negra de la provincia de El Oro, para posterior secuenciamiento y análisis de las regiones 16S (V3-V4) e ITS. Los resultados de este estudio sugieren que el microbioma endófito de la hoja proveniente del sistema de cultivo orgánico es más diverso que el convencional en su estado basal. Además, el microbioma en presencia del patógeno responde diferente en la comunidad fúngica dependiendo del sistema de cultivo. El orgánico disminuye su diversidad y el convencional aumenta. Nuestros resultados revelan que un ASV correspondiente al género *Pseudomonas* sp. se encuentra aumentado en la hoja orgánica sana y se ubica dentro del clado de la especie *P. fluorescens*, un microorganismo benéfico para las plantas. Sin embargo, para comprobar los resultados es necesario realizar bioensayos con aislados. En resumen, el microbioma de banano es dependiente del sistema de cultivo y esta condición influye significativamente en los cambios del microbioma con la presencia de la sigatoka negra.

**Palabras clave:** Microbioma endófito, filósfera, orgánico, convencional, *Pseudomonas* sp.

## ABSTRACT

The black leaf streak or black sigatoka (*Pseudocercospora fijiensis*) is the pathogen causal agent of the most devastating foliar disease in Cavendish banana plantations (*Musa x paradisiaca*). Endophytic microorganisms associated with the pathogen's wounding could benefit the plant with characteristics such as antagonism or promotion of plant immunity. Detecting changes in the composition of microbial diversity and structure gives us an important idea of the interaction between the disease state and the microbiome associated. However, the microbial variations, as a pathogen enters a plant's phyllosphere, is not yet well characterized. Therefore, this study aims to characterize the bacterial and fungal microbiome of the banana leaf in healthy and diseased states, evaluating organic and conventional agronomic management. To fulfill this objective, a systematic literature search was conducted, we found that the diversity of the foliar microbiome varies depending on the pathogen's lifestyle. On the other hand, samples of healthy banana leaves infected with black sigatoka from El Oro province were collected for subsequent sequencing and analysis of the 16S (V3-V4) and ITS. The results of this study suggest that endophytic microbiome of banana leaves from the organic farming system is more diverse than the conventional one in its basal state. Furthermore, in the presence of the pathogen, the phyllosphere microbiome responds differently in the fungal community depending on the farming system. The organic leaves decrease its diversity and the conventional increases. Our results also reveal that an ASV corresponding to the genus *Pseudomonas* sp. it is found increased in the healthy organic leaf and is located within the clade of the species *P. fluorescens*, a beneficial microorganism for plants. However, to verify the results it is necessary to carry out bioassays with isolates. In summary, the banana's leaf endophyte microbiome is dependent on the cultivation system and this condition significantly influences the changes in the microbiome with the presence of black leaf streak disease.

**Key words:** Endophyte microbiome, phyllosphere, organic, conventional, *Pseudomonas* sp.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN .....	9
MÉTODOS .....	13
Revisión sistemática de literatura.....	13
Recolección de muestras .....	13
Desinfección y conservación.....	14
Recuperación de endófitos .....	14
Extracción de ADN y secuenciamiento de microbioma .....	15
Procesamiento de datos .....	16
Análisis de datos.....	17
RESULTADOS.....	18
Influencia del estilo de vida del patógeno en diversidad microbiana: Revisión sistemática de literatura.....	18
Diversidad Alpha y composición filogenética microbiana en estado basal: Experimentación in situ.....	19
Cambio del microbioma en presencia de <i>P. fijiensis</i> .....	20
Identificación de microorganismos de interés.....	20
Core microbiome.....	21
DISCUSIÓN .....	23
Estilo de vida del patógeno define diversidad microbiana.....	23
Mayor diversidad microbiana en plantación orgánica .....	24
<i>Pseudomonas</i> sp. como potencial controlador biológico .....	26
CONCLUSIONES .....	28
TABLAS .....	29
FIGURAS .....	32
REFERENCIAS.....	37
ANEXOS .....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Términos de búsqueda empleados el número total de publicaciones para cada base de datos .....	298
<b>Tabla 2.</b> Mejores hallazgos de artículos experimentales resultado de la revisión sistemática de literatura .....	29
<b>Tabla 3.</b> Diversidad Alpha según manejo agronómico en estado sano.....	310
<b>Tabla 4.</b> Diversidad Alpha según manejo agronómico en presencia de <i>P. fijiensis</i> .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de filtros realizados para la revisión sistemática de literatura .....	322
<b>Figura 2.</b> Clasificación general de los mejores 46 artículos escogidos .....	333
<b>Figura 3.</b> Composición filogenética de hojas de banano en estado basal <b>(a)</b> del gen 16S rRNA (V3-V4) y <b>(b)</b> de la región ITS. ....	333
<b>Figura 4.</b> Cambio en composición filogenética en presencia de <i>P. fijiensis</i> <b>(a)</b> para el gen 16S rRNA y (V3-V4) y <b>(b)</b> la región ITS.....	34
<b>Figura 5.</b> Heatmap plotado con ASVs de muestras bacterianas. El gráfico muestra el enriquecimiento diferencial de ASVs dependiendo del estado de salud y el manejo agronómico. ....	35
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético realizado con Maximum Likelihood entre el ASV3_Pseudomonas, <i>P. fluorescens</i> y <i>P. syringae</i> . ....	35
<b>Figura 7.</b> Riqueza de ASVs por muestra y compartidos orgánico (O), convencional (C), sano (S) y enfermo (E) para <b>(a)</b> bacterias y <b>(b)</b> hongos. ....	36
<b>Figura 8.</b> Heatmap plotado con el core microbiome <b>(a)</b> bacteriano correspondiente a 21 ASVs y <b>(b)</b> fúngico correspondiente a 3ASVs. ....	36

## INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos multicelulares que proveen diversos ambientes o nichos ecológicos que son ocupados por una amplia gama de microorganismos (Trivedi et al., 2020), estos, a su vez forman asociaciones complejas y presentan diferentes roles esenciales en el desarrollo del hospedador entre ellos propiedades patogénicas, beneficiosas y algunos pueden no presentar un efecto directo sobre su hospedador (Liu et al., 2020). Esto ocurre en los órganos situados bajo el suelo, al igual que los que se encuentran en la superficie. La filósfera hace referencia a las regiones aéreas de la planta, que en su mayoría son hojas (Vorholt, 2012) y en ellos habitan microorganismos en la superficie, conocidos como epífitos, así como dentro del tejido de la hoja, llamados endófitos (Liu et al., 2020).

Por lo tanto, el microbioma hace relación a todos los microorganismos asociados a una planta o a una región específica de ella (Vorholt, 2012). Ensayos cultivo independientes, realizados en su mayoría en la última década, han permitido descifrar la composición taxonómica del microbioma asociado a plantas en diferentes estados y bajo varios estímulos (Kim et al., 2012). El ensamblaje microbiano revelado en estos estudios no ocurre al azar (Vorholt, 2012), al contrario, se ha determinado que es producto de una selección derivada, principalmente, del genotipo de la planta y, posteriormente, de otros factores como estímulos bióticos y abióticos (Humphrey & Whiteman, 2020). La endósfera de las hojas presenta una composición poblacional similar entre especies y que se diferencia significativamente del resto de la planta (De Souza et al., 2016). La comunidad bacteriana se encuentra dominada por los filos Proteobacteria y Firmicutes, mientras que la vasta mayoría de hongos que colonizan la endósfera provienen de los filos Ascomycota y Basidiomycota (Trivedi et al., 2020).

Datos explorados anteriormente sugieren que los microorganismos con la capacidad de colonizar la endósfera de la hoja tienen la necesidad de poseer motilidad, la habilidad de

degradar la pared celular vegetal y activan en el huésped especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu et al., 2017). Se conoce que en las raíces cuando hay deficiencia de nutrientes específicos el estado inmunológico de la planta se reprime y esta recluta microorganismos que colonizan la planta creando un ensamblaje microbiano específico que incrementa la biodisponibilidad de los nutrientes en deficiencia (Bodenhausen et al., 2019; Castrillo et al., 2017), moviliza los nutrientes dentro del hospedador y además puede cambiar el metabolismo de la planta mediante la excreción de moléculas para redireccionar la energía generada a otros destinos metabólicos (Lu et al., 2018).

Así mismo, la presencia de comunidades heterogéneas en la endósfera del hospedador le provee a este último modificaciones metabólicas que le confieren resistencia a patógenos además de secretar sustancias antimicrobianas que los repelen (Cha et al., 2015). Ensamblajes microbianos específicos confieren tolerancia al estrés abiótico (Rastogi, Coaker & Leveau, 2013). En conjunto, el microbioma puede modificar el proceso evolutivo de una especie incrementando el fitness de la planta. En este contexto, se considera que el microbioma asociado a un organismo es un genoma extendido que juega un rol fundamental en el desarrollo del hospedador (Fitzpatrick, Mustafa & Viliunas, 2019; Eida et al., 2018). Estas propiedades están bien caracterizadas en las comunidades microbianas asociadas a la raíz, tanto en la endósfera como en la rizósfera, sin embargo, en la región superior de la planta los estudios son escasos y actualmente existen muy pocos ensayos que demuestran el defecto del microbioma de la filósfera (Lei Lei, 2020; Chen et al., 2020).

El microbioma de la filósfera sana se encuentra bien caracterizado, es bastante consistente entre especies y sigue patrones claros en cuanto a abundancia relativa de los filos Proteobacteria y Firmicutes. Disbiosis es la condición en la que existe un desbalance en la microbiota y éste se encuentra asociado a un fenotipo de enfermedad (Chen et al., 2020), al analizar el microbioma bajo esta condición, esto describe un cambio en la composición

microbiana asociado a un fenotipo enfermo, siendo más específicos en presencia de un patógeno, existe un drástico aumento de la población del filo Proteobacteria y disminución de Firmicutes que ha sido reportado en ataques de patógenos fúngicos, bacterianos e insectos (Purahoug et al., 2018; Humphrey & Whiteman, 2020; Smets & Koskella, 2020; Chen et al., 2020). Además de la disminución en la diversidad (Li et al., 2020; Purahough et al., 2018; Chen et al., 2020). Aunque a diferencia de la rizósfera este cambio en disbiosis en la mayoría de los casos reportados no es beneficioso para el hospedador, es decir, en la hoja, no se están reclutando microorganismos que mejoren la respuesta vegetal contra el patógeno (Smets & Koskella, 2020; Humphrey & Whiteman, 2020). Un estudio reciente realizado por Chen y colaboradores logró demostrar que un ensamblaje microbiano disbiótico es el agente causal del fenotipo en la planta (Chen et al., 2020). Estos hallazgos abren puertas al desarrollo de tecnologías basadas en ensamblajes microbianos sanos que permitan revertir el estado disbiótico y le devuelvan el estado sano al hospedador (Smets & Koskella, 2020).

El banano (*Musa* spp.) es el cuarto producto de interés agronómico más importante a nivel global, para esta gran demanda Ecuador es el mayor exportador abarcando el 34% del mercado (Evans & Ballen, 2018). A nivel mundial los cultivos de banano Cavendish se ven afectados por el patógeno foliar más devastador para estas plantaciones *Pseudocercospora* (antes *Mycosphaerella*) *fijiensis* o comúnmente denominado Sigatoka Negra, es un hongo Ascomyceto hemibiotrófico heterotálico (Churchill, 2011). Actualmente, el único manejo fitosanitario en plantaciones afectadas es la aplicación semanal de fungicidas sintéticos (Manzo-Sánchez et al., 2019). Lo que representa un porcentaje considerable de los costos de producción (Churchill, 2011), además de tener como consecuencia impactos negativos a nivel ecológico y de salud pública (Kimunye et al., 2020).

Los estudios realizados en microbioma de banano se enfocan, casi en su totalidad, en los órganos que se encuentran bajo la superficie de la tierra (Fu et al., 2017; Liu et al., 2019;

Xue et al., 2015). El estudio realizado por Köberl y colaboradores es el único reportado que explora el microbioma de la filósfera del banano, sin embargo se enfoca en el secuenciamiento de Gammaproteobacterias evaluando diferentes manejos agronómicos y regiones geográficas. Este estudio revela gran abundancia de los órdenes *Pseudomonadales*, *Enterobacteriales*, *Legionellales* y *Xanthomonadales* en la endósfera de la hoja siendo Enterobacterias el grupo dominante (Köberl et al., 2015).

Los objetivos del presente estudio son determinar patrones de cambios en el microbioma frente a enfermedades foliares en una revisión sistemática de literatura y, por otro lado, caracterizar el microbioma endófito de la hoja de banano en presencia y ausencia de sintomatología de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) contrastando manejo orgánico y convencional en la provincia de El Oro, Ecuador.

## MÉTODOS

### Revisión sistemática de literatura

Para abordar los términos de la búsqueda sistemática en bases de datos relevantes, se definió previamente las siguientes preguntas: ¿Cuál es el estado actual en estudios de microbioma de la filósfera en relación con patógenos foliares?; ¿Existen patrones de respuesta del microbioma frente al ingreso de patógenos?; si es así, ¿Cuáles son los patrones y de qué dependen?; ¿Existen estudios del microbioma endófito de la hoja en banano? Las bases de datos usadas para abordar estas preguntas fueron Scopus y Scholar Google; los términos y operadores lógicos booleanos fueron "Phyllosphere microbiome", "Leaf microbiome", "Phyllosphere microbiota", "Leaf microbiota", para cada uno de estos las variaciones AND "pathogen" y OR "disease" como se muestra en la **Tabla 1**. La búsqueda incluyó estudios desde el 2014 hasta el 13 de septiembre del 2020, fecha de finalización de búsqueda. El primer filtro de selección se realizó observando los títulos, incluyendo estudios asociados a enfermedad y salud de la planta. El segundo se realizó analizando los abstracts. En el último filtro se analizó el cuerpo del estudio, principalmente los objetivos y la metodología (Mengist et al., 2020).

### Recolección de muestras

En el mes de mayo del 2019 con localización en el cantón Santa Rosa, provincia de El Oro, se recolectó muestras de hojas de banano de dos plantaciones. La primera es la hacienda "Central, San José" con coordenadas 3°21'18.0"S 79°54'05.8"W, esta posee un manejo fitosanitario orgánico usando controladores biológicos, compostaje y fertilizantes orgánicos. Mientras que la hacienda "Cueva" cuya coordenada es 3°21'33.7"S 79°54'58.3"W, se encuentra bajo manejo convencional usando fungicidas e insecticidas sintéticos de manera rotatoria, además de fertilizantes sintéticos. Se seleccionó el tercio medio de la cuarta hoja de plantas muestreadas aleatoriamente con y sin sintomatología de sigatoka negra. En el campo

se realizó un lavado con una solución estéril compuesta por bifosfato de sodio 45.9 mM, fosfato disódico 61.6 mM y 0.1% Tween 20. Posteriormente, se conservó a 4°C para su transporte al laboratorio (Lu-Irving et al., 2019).

### **Desinfección y conservación**

Una vez en el laboratorio, las hojas se cortaron en secciones pequeñas con el fin de facilitar su procesamiento. Se desinfectó la superficie foliar, dentro de una cámara de flujo laminar manteniendo condiciones de asepsia, con una solución de hipoclorito de sodio al 10% y Tween al 0.1% durante dos minutos. Luego se eliminó los residuos del desinfectante en agua destilada estéril durante dos minutos más. Finalmente, se dejaron secar las muestras en papel estéril (Lu-Irving et al., 2019). Cuando las muestras se secaron se las congeló con nitrógeno líquido previo a liofilizarlas, con el fin de conservar la población de endófitos.

### **Recuperación de endófitos**

La digestión enzimática se llevó a cabo con un buffer compuesto por Macerozyme al 0.1%, celulasa al 1%, D-Manitol 0.7 M, MES 5 mM, cloruro de calcio di hidratado 9 mM, fosfato diácido monobásico 65  $\mu$ M ajustado a un pH de 5.7. La cual, se incubó con las muestras en un shaker que se encontraba a 28°C, 125 rpm, durante 12 horas, en una relación 5:1 buffer (Jiao et al., 2006).

Pasadas las 12 horas de digestión del tejido foliar se realizó dos centrifugaciones seriadas a 200rpm durante cinco minutos, rescatando el sobrenadante y evitando incluir restos de tejido foliar. La última centrifugación se llevó a cabo a 3000 rpm durante veinte minutos, con el fin de rescatar los microorganismos endófitos presentes en la solución. El pellet se resuspende en solución salina y se conserva a -20°C en tubos Eppendorf (Jiao et al., 2006).

## Extracción de ADN y secuenciamiento de microbioma

La extracción de ADN de hongos y bacterias endófitas recuperadas se realizó con el kit comercial DNeasy Powersoil<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Alemania) usando el protocolo estándar establecido en el kit (Lu-Irving et al., 2019). La concentración y el grado de pureza de las muestras se midieron usando Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA).

Para bacterias se amplificó la región V3 – V4 del gen 16S rRNA usando los primers 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Se añadieron dos barcodes y 6 cambios en marcos de lectura en el extremo 5' del primer 338F, y en el primer 806R basado en el protocolo (Finkel et al., 2019). Cada reacción de PCR se realizó por triplicado y cada una incluye una mezcla única de 3 primers con cambio de marco para cada plato. El protocolo de PCR se realizó con 5  $\mu$ l de Kapa Enhancer, 5  $\mu$ l de Kapa Buffer A, 1.25  $\mu$ l of 5  $\mu$ M de cada primer y 0.375  $\mu$ l de una mezcla de PNAs, 0.5  $\mu$ l de Kapa dNTPs, 0.2  $\mu$ l Kapa Robust Taq (Kapa Biosystems, Wilmington, MA), 8  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l DNA. Las condiciones de temperatura son: 95°C durante 60 segundos, 24 ciclos de 95°C por 15 segundos, 78°C durante 10 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente, 4°C hasta su uso (Finkel et al., 2019). Los amplicones se purificaron con beads magnéticos AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA) y se cuantificaron mediante el uso del fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El secuenciamiento se llevó a cabo usando 10 pM en el equipo Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) como describen (Finkel et al., 2019).

En cuanto a la región ITS los primers usados son ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (). Las muestras de ADN se diluyeron a concentraciones de 3.5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Luego se prepararon reacciones por triplicado compuestas por 10 ng de ADN, 1 U de buffer, 0.3% de suero bovino

de albúmina, 2 mM de cloruro de magnesio, 200  $\mu$ M de dNTPs, 300 nM de cada primer y 2 U de DFS-Taq DNA polimerasa (Bioron, Ludwigshafen, Alemania). Las condiciones del ciclo son 2 minutos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, finalmente, la terminación del protocolo se realizó a 72°C durante 10 minutos (Finkel et al., 2019). El producto del PCR atravesó un proceso de purificación con exonucleasas. Además, se realizó un segundo protocolo de PCR con el fin de añadir los barcodes específicos para las muestras. Luego, se purificó los amplicones con el kit AMPure XP. Finalmente, se unieron las muestras en proporciones iguales y se diluyó a 10 pM para su posterior secuenciamiento. El secuenciamiento se llevó a cabo en el equipo Illumina MiSeq usando el kit 600-cycle V3 (Finkel et al., 2019).

### **Procesamiento de datos**

Los datos producto de la secuenciación del 16S se procesaron mediante MT-Toolbox (Yourstone et al., 2014). Los reads que se obtuvo como output de MT-Toolbox fueron filtrados mediante Sickle, evitando Q scores menores a 20 (Joshi & Sickle, 2011). Luego del primer filtro, todas las secuencias que poseían reads menores a 1000 fueron descartadas. Posteriormente, usando el paquete de R DADA2 versión 1.8.1 se colapsaron las secuencias resultantes del quality filtering. Por último, la asignación taxonómica de ASVs se llevó a cabo mediante el método naïve Bayes kmer en DADA2, usando la base de datos Silva 132 (Callahan et al., 2016).

Por otro lado, las secuencias del ITS fueron procesadas con el paquete DADA, usando los parámetros default en los reads forward. La asignación taxonómica de los ASVs se realizó implementando el método naïve Bayes kmer, usado en el paquete MOTHUR usando la base de datos UNITE (Callahan et al., 2016; Schloss et al., 2009).

## **Análisis de datos**

Las tablas de conteo resultantes se analizaron con los paquetes de R Ohchibi, ComplexHeatmap y Pheatmap. Los parámetros de  $\alpha$ -diversidad y los filogramas se realizaron con el paquete Ohchibi (Finkel et al., 2019). Por otro lado, el paquete ComplexHeatmap se usó para realizar los UpSet plots que permitieron determinar el core microbiome (asignación taxonómica de ASVs), que en este caso se define como todos los microorganismos endófitos presentes en la hoja independientemente del estado de salud o sistema de manejo agronómico bajo el que se encuentre la planta; así como otros consorcios de ASVs en común entre muestras (Gu, 2020). Además, el paquete Pheatmap se usó para realizar heatmaps que permiten determinar ASVs enriquecidos y disminuidos sobre la media en cada muestra, basándose en el Z-score (Kolde, 2019). Finalmente, se realizó un árbol filogenético mediante el algoritmo Maximum Likelihood y modelo Namuri Tei para comparar los ASVs de interés con secuencias de la base de datos RDP para procariotas (Adhikari et al., 2015).

## RESULTADOS

### **Influencia del estilo de vida del patógeno en diversidad microbiana: Revisión sistemática de literatura.**

Los términos de búsqueda, que se muestran en la **Tabla 1**, se concentran principalmente en microbioma de la filósfera en patogénesis, con ciertas variaciones en los términos. La revisión se realizó en Scopus, que es una base de datos internacional que compila publicaciones peer-reviewed mundial, y Scholar Google que permite cubrir publicaciones que no se encuentran en la base de datos anterior. Se obtuvo un total de 1536 artículos científicos, **Figura 1.**, de los cuales se selecciona 104 basándose en el título. Después de realizar la revisión del abstract, el cuerpo del estudio y, en más detalle, la metodología se obtuvo un total de 14 artículos científicos experimentales que se muestran en detalle en la **Tabla 2**. Se muestra que, en cuanto a bacterias, 9 de los 14 artículos analizan diversidad Alpha y en 7 estudios la diversidad disminuye independientemente de la forma de vida del patógeno, en 1 aumenta y en 1 se observan cambios.

Por otro lado, solo 5 de los 14 artículos analizan diversidad alpha de la comunidad fúngica. De estos, en 3 disminuye la diversidad en presencia del patógeno, los mismos en los que el patógeno estudiado tiene forma de vida biótrofa. Mientras que, en los 2 artículos restantes la diversidad alpha aumenta y esto ocurre cuando el patógeno es hemibiótrofo. En particular, el estudio de Luo y colaboradores publicado en 2019 analiza un estadio inicial de la infección, un estadio intermedio y uno final. En el estudio demuestran que, en la fase intermedia, fase biotrófica, la diversidad disminuye y en la fase final de la infección, fase necrótrofica, la diversidad vuelve a aumentar. En cuanto a la composición filogenética, el filo bacteriano más abundante es Proteobacteria y para hongos es Ascomycetes.

## **Diversidad Alpha y composición filogenética microbiana en estado basal:**

### **Experimentación in situ.**

En este estudio, se colectó y secuenció los datos de 4 muestras de las hojas de banano. Se obtuvo un total de 52,717 conteos de la región 16S (V3-V4) y 575,599 conteos de la región ITS. Una vez realizado el análisis de las secuencias éstos se clasifican en 410 ASVs bacterianos y 234 ASVs fúngicos. Los índices de diversidad Alpha, Chao1, Shannon, Inv Simpson y Evennes, de bacterias y hongos analizados en el estado basal se encuentran en la **Tabla 3**. Se observa que tanto para bacterias como para hongos todos los parámetros de diversidad son mayores en el sistema de manejo agronómico orgánico.

En la **Figura 3** se observa la abundancia relativa de la composición filogenética, en la sección (a) el filo bacteriano más abundante en ambas plantaciones es Proteobacteria con 77.67% y 96.29% de abundancia relativa en convencional y orgánico respectivamente. Se muestra baja abundancia de Firmicutes, en general, pero la abundancia es mayor en la hoja convencional con 21.08%. A nivel de género, se observa que el más abundante es *Pantoea* spp. con una media de 65.61% de abundancia relativa. El segundo género más abundante en sistema orgánico es *Pseudomonas* spp. con 31.46% y en convencional un género no identificado de la familia Clostridiaceae con 20.86%.

En la sección (b) la comunidad fúngica de la plantación orgánica muestra distribución uniforme en los órdenes presentes, siendo Eurotiales y Malasseziales los más abundantes con 23.32% y 25.23% respectivamente. Por otro lado, la hoja de la plantación convencional se ve dominada, en su mayoría por los órdenes Cystobasidiales y Sporidiobolales con 53.89% y 31.14% respectivamente. En cuanto a género, la distribución se observa similar, siendo

*Cystobasidium* spp. con 53.89% y *Rhodotorula* spp. con 31.14% los géneros que dominan la población de la hoja convencional.

### **Cambio del microbioma en presencia de *P. fijiensis***

La **Tabla 4** muestra que todos los parámetros de diversidad Alpha del microbioma bacteriano en la plantación orgánica disminuyen en presencia del patógeno. Por otro lado, en la hoja sometida a manejo convencional los parámetros de diversidad Alpha disminuyen en presencia del patógeno, con excepción de el índice de Shannon que va de 1.95 en estado sano o basal, a 1.97 en enfermo. La comunidad fúngica muestra mayor diversidad Alpha en todos los parámetros del estado sano de la plantación orgánica, mientras que en la plantación convencional el estado enfermo se muestra con mayor diversidad, con excepción de Chao1 de varía de 38 en sano a 31 en enfermo (**Figura 7**).

En cuanto a la composición filogenética que se muestra en la **Figura 4**, la comunidad bacteriana en la sección (a), la hoja orgánica muestra incremento de la población del filo Firmicutes de 0.83% a 54.79% y disminución de Proteobacteria de 96.29% a 41.38% en presencia de *P. fijiensis*. Mientras que la hoja convencional muestra el efecto contrario, y Proteobacteria domina la población de 77.67% en estado sano hasta 98.54% al final de la infección. Por otro lado, en la población fúngica de la plantación orgánica el orden Pleosporales domina la población en patogénesis con 66.30%. Mientras que, en convencional, cuando entra el patógeno la población fúngica que se ve más uniforme, el orden más abundante es Capnodiales.

### **Identificación de microorganismos de interés**

La **Figura 5** muestra los ASVs bacterianos presentes en todas las muestras. Se observa que las muestras de la plantación orgánica presentan clusters definidos de escasos ASVs que se encuentran altamente enriquecidos sobre la media. Además, todos los ASVs que

se encuentran sobre la media en el estado sano, disminuyen en presencia del patógeno y en este último estado tres ASVs correspondientes al género *Pantoea* sp. y dos géneros no clasificados pertenecientes a las familias Microbacteriaceae y Clostridiaceae incrementan sobre la media. Por otro lado, las hojas del cultivo convencional muestran un espectro más amplio de ASVs aumentados, tanto en sano como en el estado enfermo.

El cluster que posee ASVs enriquecidos en la hoja de la planta sana que se encontraba en la plantación orgánica es exclusivo de esta muestra, es decir, en ninguna de las otras muestras se observa enriquecimiento evidente de estos ASVs. En este contexto, la **Figura 6** expone un árbol filogenético creado para el ASV3 correspondiente al género *Pseudomonas* sp. enriquecido en la muestra sana orgánica, en él se observa que el ASV3 se ubica en el clado exclusivo de *Pseudomonas fluorescens* y se separa del clado de *Pseudomonas syringae*.

### **Core microbiome**

La sección (a) de la **Figura 7** muestra mayor riqueza de ASVs bacterianos en las muestras del manejo agronómico convencional incrementando el número de ASVs de sano a enfermo. Mientras que el manejo orgánico muestra menor número de ASVs en general y estos disminuyen a alrededor de la mitad en presencia del patógeno. El core microbiome, que en este caso corresponde a los ASVs que se comparten independientemente del manejo agronómico y el estado de salud vegetal. La composición del core bacteriano se encuentra en la sección (a) de la **Figura 8**, la composición del core se encuentra dominada por ASVs asignados al género *Pantoea* sp., varios ASVs de la familia Enterobacteriaceae y un ASV asignado a *Pseudomonas* sp. Se observa que la composición se diferencia dependiendo del estado de salud del huésped y claros clusters definidos para cada muestra. El cluster a que se compone por dos ASVs del género *Pantoea* sp. se encuentran incrementados de manera exclusiva en la muestra orgánica enferma, el cluster b compuesto por Enterobacterias y *Pantoea* sp. se incrementa en la muestra convencional enferma, además del cluster c.2

compuesto por diferentes ASVs con las mismas asignaciones taxonómicas. Por otro lado, el cluster c es compartido por las muestras del manejo convencional siendo el c.1 exclusivo para el estado sano. Además, las muestras orgánicas sanas poseen ASVs incrementados de los géneros *Pantoea* sp. y *Pseudomonas* sp. de manera exclusiva.

La sección **(b)** de la **Figura 7** muestra que la riqueza fúngica presente en las muestras pertenecientes a la hoja orgánica sana es más de cuatro veces mayor que la presente en las otras muestras. Además, el core fúngico solo comprende a tres ASVs que en la sección **(b)** de la **Figura 8** pertenecen a los géneros *Malassezia* sp., *Purpureocilium* sp. y ASV no identificado. Los ASVs de las muestras sanas no se encuentran incrementados.

## DISCUSIÓN

Los estudios de microbioma endófito de la filósfera son cada vez más informativos debido a recientes estudios que demuestran causalidad de un ensamblaje microbiano específico sobre efectos disbióticos en el fenotipo foliar de la planta (Chen et al., 2020). Sin embargo, estos estudios en planta de banano son escasos y frente a diversos patógenos amenazando la seguridad alimentaria de la fruta más consumida a nivel mundial, existe un creciente interés en generar opciones que contribuyan a la sostenibilidad agronómica.

### **Estilo de vida del patógeno define diversidad microbiana**

Los mecanismos de patogénesis de los microorganismos varían dependiendo de su estilo de vida. De la misma manera, la respuesta en la planta a nivel molecular es diferente. Un patógeno biótrofo toma nutrientes de la planta mediante estructuras especializadas manteniendo al huésped vivo, este tipo de patógenos desencadena una cascada de reacciones en la planta llamada resistencia sistémica adquirida mediada por la hormona ácido salicílico. Por otro lado, los patógenos necrótrofos liberan toxinas que matan los tejidos vegetales y la reacción en la planta se denomina resistencia sistémica inducida y se ve dirigida por la molécula ácido jasmónico. Existe también una combinación de los dos estilos de vida que depende del estado de desarrollo del patógeno y se denomina hemibiótrofo (Pieterse et al., 2009).

La revisión sistemática de literatura realizada en este estudio y los resultados obtenidos sugieren que el estilo de vida del patógeno además de definir patrones moleculares de respuesta, también determina la diversidad fúngica en la hoja de una planta huésped (**Tablas 2 y 4**). Cuando un patógeno biótrofo coloniza la superficie foliar, al mantener vivo el tejido, este domina la población microbiana y consecuentemente se observa disminución en la diversidad fúngica (Li et al., 2020; Zhang et al., 2018, 2019). Por otro lado, si un patógeno hemibiótrofo infecta se observa un incremento en la diversidad fúngica al final de la

infección, cuando el patógeno se encuentra necrosando el tejido foliar debido a que puede encontrarse debilitado el tejido llegando microorganismos saprófitos que colonizan los tejidos y se benefician de estos (Griffiths et al., 2020; Luo et al., 2019). Sin embargo, el patógeno con forma de vida hemibiótrofo se comporta como biótrofo al inicio de la infección y en un estado intermedio la diversidad fúngica disminuye para luego incrementar en necrosis (Luo et al., 2019). Por otro lado, la composición bacteriana independientemente del estilo de vida del patógeno muestra disminución en la diversidad. Además, se observa que no existen estudios detallados de microbioma de la hoja en plantas de banano. Existe un estudio que evalúa la diversidad y composición filogenética del grupo Gammaproteobacteria, de la hoja bajo diferentes ubicaciones geográficas. Este estudio revela que el microbioma de la hoja se encuentra dominado por los géneros *Pseudomonas* sp. y *Enterobacteria* sp. (Köberl et al., 2015).

### **Mayor diversidad microbiana en plantación orgánica**

Los microbiomas en su estado basal entre sistemas de manejo agronómico presentan diferencias estructurales y de diversidad claras. Aunque en comparación con otros estudios lo revelado en el presente estudio no es precisamente consiste en términos de alpha diversidad. Al igual que este estudio, existe otra evaluación en plantas de uva que demuestra un aumento de diversidad en la plantación orgánica (Perazzolli et al., 2014). Sin embargo, se realizó un estudio similar en trigo que no demuestra diferencias significativas (Gdanetz & Trail, 2017). En composición filogenética, Proteobacteria corresponde al filo de bacterias más abundante en microbioma vegetal, independientemente de la región, el manejo de cultivo y de la fracción de la planta (Trivedi et al., 2020). El aumento del filo Firmicutes en la plantación convencional se ha observado antes en la filósfera de maíz (Gdanetz & Trail, 2017). Por otro lado, evaluando a nivel de género *Pantoea* sp. corresponde al género de bacterias más comunes en la filósfera de la planta (Wagner et al., 2020). Los patrones bacterianos se

encuentran bien documentados, sin embargo, los estudios que caractericen las poblaciones microbianas fúngicas en diferentes manejos agronómicos son nulos. Es necesario tomar en cuenta que los manejos agronómicos orgánicos pueden variar mucho en las prácticas aplicadas en el cultivo de una misma especie y en diferentes especies, por lo que es necesario tomar en cuenta este factor en la evaluación del microbioma.

Se conoce que al entrar un patógeno las comunidades microbianas que residen en la endósfera de la hoja atraviesan cambios en cuanto a estructura y diversidad. En el caso de las bacterias, disminuye la diversidad y el patrón general de disbiosis es que la abundancia de Firmicutes disminuya y aumente en el filo Proteobacterias lo que ocurre en la plantación convencional, más no en la plantación orgánica (Chen et al., 2020; Humphrey & Whiteman, 2020; Purahong et al., 2018; Smets & Koskella, 2020). En la respuesta observada en la plantación orgánica no se ha reportado anteriormente en evaluaciones de microbioma foliar frente a disbiosis. Por otro lado, la disminución en la diversidad bacteriana en disbiosis ha sido reportada anteriormente (Chen et al., 2020; Li et al., 2020; Purahong et al., 2018).

Aunque los hongos del microbioma han sido, en general, escasamente explorados, los pocos reportes existentes demuestran que Ascomycetes es el filo más abundante en la filósfera de plantas sanas y enfermas (Griffiths et al., 2020; Li et al., 2020; Luo et al., 2019; Zhang et al., 2018, 2019), y la clase Dothideomycetes incrementa en la entrada de un patógeno (Griffiths et al., 2020; Li et al., 2020). La diversidad en hemibiótrofos, al igual que el patógeno de interés *P. fijiensis*, incrementa al final de la infección lo que ocurre en la plantación convencional (Griffiths et al., 2020; Luo et al., 2019). Sin embargo, la plantación orgánica una vez necrosado el tejido la diversidad disminuye, lo que no se ha reportado anteriormente en la literatura.

Esto sugiere que realmente existen patrones de respuesta en la diversidad y composición filogenética que se ajustan más a lo que ocurre en la hoja de banano de una plantación convencional. Lo observado en las comunidades fúngicas de plantación orgánica no se ha reportado anteriormente, por lo tanto, es un punto de investigación interesante para prospección sobre microorganismos que probablemente están interviniendo de manera activa en el control sobre el desarrollo del patógeno.

### ***Pseudomonas* sp. como potencial controlador biológico**

Entre los microorganismos que se encuentran aumentados en la muestra del planta orgánica sana se encuentra el género *Pseudomonas* sp. Este género comprende cientos de especies que poseen características como potenciadores de crecimiento y controladores biológicos mediante diversos mecanismos (Hesse et al., 2018). Sin embargo, dentro de este género también se encuentra una especie fitopatógena que en las últimas décadas se ha convertido en un modelo de estudio que ha llevado a la ciencia vegetal a comprender diversos patrones de patogénesis (Katagiri et al., 2002). Existen varias cepas de la especie *Pseudomonas fluorescens* que han sido evaluadas como prometedoras en plantas de banano para el control de *Fusarium oxysporum* (Selvaraj et al., 2014). Desde entonces, se han realizado varias evaluaciones de esta especie como antagonistas a diversos fitopatógenos como Fusarium wilt (*F. oxysporum* f. sp. ciceris), blight del arroz (*Rhizoctonia solani*), blast del arroz (*Pyricularia oryzae*), entre otras (Bubici et al., 2019).

*Pseudomonas fluorescens* Pf1 es una cepa bacteriana que produce sideróforos, cianido de hidrógeno, antibióticos y pioluteorina, además induce la resistencia asociada a enzimas en raíces de plantas de banano para combatir Foc (Akila et al., 2011). En base a estos reportes se han realizado diversos ensayos demostrando la efectividad de varios formulados y protocolos de aplicación de *P. fluorescens* Pf1 contra Fusarium Wilt. Además, se conoce que la aplicación de formulados de esta cepa provee mayor protección a estrés ambiental a plantas

de banano (Bubici et al., 2019). *P. fluorescens* Pf1 es un ejemplo de microorganismos que atraviesan procesos evolutivos de especialización con la planta huésped de banano para conferirle características que le provean beneficios para combatir la colonización del tejido vegetal por fitopatógenos. Hemos mencionado que el potencial de interacción planta microbioma en la región inferior, es decir, bajo la superficie de la tierra, ha sido ampliamente explorado (Trivedi et al., 2020). Por esto, explorar y explotar el potencial del microbioma foliar que se encuentran en la región de infección en la planta interactuando directamente con el patógeno es un área muy interesante por explorar.

## CONCLUSIONES

- 1) La revisión sistemática de literatura muestra que la diversidad bacteriana de la filósfera disminuye su diversidad en presencia del patógeno independientemente de su forma de vida. Mientras que el microbioma fúngico si responde frente a la forma de vida del patógeno disminuyendo cuando este es biótrofo y aumentando cuando es hemibiótrofo.
- 2) El microbioma endófito de las hojas de banano en estado basal es más diverso para bacterias y hongos en el manejo agronómico orgánico, siendo Proteobacterias el filo más abundante en ambas plantaciones, con un ligero incremento del filo Firmicutes en la hoja perteneciente a convencional. En cuanto a hongos el filo más abundante es Firmicutes.
- 3) El microbioma bacteriano disminuye en términos de diversidad cuando *P. fijiensis* necrosa la hoja. La respuesta del microbioma fúngico frente al patógeno varía dependiendo del sistema de manejo agronómico. En el caso de la plantación convencional la diversidad aumenta al final de la infección, mientras que en el manejo orgánico la diversidad disminuye.
- 4) El hallazgo del ASV asociado a la especie de controladores biológicos *P. fluorescens*, sugiere que la endósfera de plantas que no han estado expuestas a biocidas durante largos periodos de tiempo, posee gran potencial de ser reservorio de microorganismos con propiedades beneficiosas para el desarrollo vegetal y control biológico.
- 5) El core microbiome se encuentra compuesto por 21 ASVs bacterianos y 3 fúngicos, dominados por el género *Pantoea*, la familia Enterobacteriaceae y los géneros fúngicos *Malassezia* sp. y *Purpureocillium* sp. Observándose agrupación por el estado de salud en cuanto a bacterias y manejo agronómico para hongos.

## TABLAS

**Tabla 1.** Términos de búsqueda empleados el número total de publicaciones para cada base de datos

Bases de datos	Términos de búsqueda	Número de artículos
<b>Scopus</b>	"Phyllosphere microbiome"	39
	"Leaf microbiome"	29
	"Phyllosphere microbiota"	45
	"Leaf microbiota"	24
	"Phyllosphere microbiome" AND "pathogen" OR "disease"	17
	"Leaf microbiome" AND "pathogen" OR "disease"	14
	"Phyllosphere microbiota" AND "pathogen" OR "disease"	22
	"Leaf microbiota" AND "pathogen" OR "disease"	14
<b>Scholar google</b>	"Phyllosphere microbiome"	20
	"Leaf microbiome"	323
	"Phyllosphere microbiota"	611
	"Leaf microbiota"	359
	"Phyllosphere microbiome" AND "pathogen" OR "disease"	5
	"Leaf microbiome" AND "pathogen" OR "disease"	4
	"Phyllosphere microbiota" AND "pathogen" OR "disease"	5
	"Leaf microbiota" AND "pathogen" OR "disease"	5

Para los motores de búsqueda Scopus y Scholar Google se escogió 4 términos con una variación para cada uno, se delimitó el tiempo de búsqueda desde el 2014 hasta el 2020 debido a ser el periodo de mayor densidad de investigaciones en microbiomas de la filósfera.

**Tabla 2.** Mejores hallazgos de artículos experimentales resultado de la revisión sistemática de literatura

Año	Primer autor	Especie	Patógeno	Forma de vida	Diversidad alpha				Filograma	
					Hongos	Índice	Bacterias	Índice	Hongos	Bacterias
2020	Karasov	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	Biótrofo	-	-	Disminuye	Shannon (sin datos)	Peronosporaceae	Pseudomonadaceae Burkholderaceae
2020	Perazzolli	Grapevine	<i>Plasmopara viticola</i> y <i>Erysiphe necator</i>	Biótrofo	-	-	-	-	-	Pseudomonadaceae <i>Rhizobiales</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Wolbachia</i> *
2020	Burke	<i>Fagus grandifolia</i>	<i>Litylenchus crenatae</i>	Biótrofo	-	-	-	-	<i>Rumularia</i> ( <i>Mycosphaerella</i> ) Sordariomycetes* Eurotiomycetes* Dothideomycetes* Agaricomycetes*	
2020	Li	Cítricos	<i>Diaporthe citri</i>	Biótrofo	Disminuye	Evennes (0.76 - 0.68)	Disminuye	Evennes (0.48 - 0.36)		Alphaproteobacteria Betaproteobacteria* Firmicutes
2020	Chen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sin patógeno	Disbiosis	-	-	Disminuye	Shannon (4.02 - 1.4)	-	Firmicutes
2020	Seybold	Trigo	<i>Zymoseptoria tritici</i> o <i>Mycosphaerella graminicola</i>	Hemibiótrofo	-	-	Disminuye	Richness (57 - 35)	-	Proteobacteria* Actinobacteria*
2020	Humphrey	<i>Cardamine cordifolia</i>	<i>S. nigrita</i>	Necrótrofo (Insecto)	-	-	Disminuye	Evennes (sin datos)	-	Pseudomonadaceae Actinobacteria Proteobacteria
2019	Zhang	<i>Euonymus japonicus</i>	<i>Erysiphe</i> sp.	Biótrofo	Disminuye	Sobs (334 - 105) Shannon (1.75 - 0.08) Simpson (0.32 - 0.78)	Disminuye	Shannon (sin datos) Sobs (890 - 803) Shannon (4.25 - 3.54) Simpson (0.07 - 0.14)	Ascomycetes	Firmicutes Alphaproteobacteria Cytophagia
2019	Griffiths	Ash tree	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Hemibiótrofo	Aumenta	Richness (sin datos) Evennes (sin datos)	No diferencias	-	Dothideomycetes Tremellomycetes Leotiomycetes	Betaproteobacteria Actinobacteria Proteobacteria* Firmicutes
2019	Luo	Pepino	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Lachrymans	Hemibiótrofo	Primero disminuye, luego aumenta.	Shannon (3.28 - 2.79 - 3.1) Richness (350 - 220 - 325)	Aumenta	Richness (130 - 97 - 180)	Ascomycetes	
2019	Wagner	Maiz	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> y <i>Setosphaeria turcica</i>	Hemibiótrofo	-	-	-	-	-	<i>Pantoea</i> sp.
2018	Zhang	Calabaza	Powdery mildew	Biótrofo	Disminuye	Richness (182.25 - 110.25) Shannon (1.23 - 0.90) Inv Simpson (2.03 - 1.61) Chao1 (279.47 - 181.91)	-	-	Ascomycetes	-
2018	Purahong	Kiwi	<i>Pseudomonas syringae</i>	Hemibiótrofo	-	-	Disminuye	Richness (492 - 246) (256-59) Shannon (4.02 - 2.95) (2.99 - 0.57) Simpson (11.93 - 8.09) (7.16 - 1.23)	-	<i>Proteobacteria</i> sp. Firmicutes*
2016	Ritpitakphong	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Biótrofo	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobium</i>

La tabla muestra el detalle de los mejores hallazgos de artículos experimentales, se especifica los índices analizados y la variación de éstos entre paréntesis, mostrando primero el dato de la muestra sana y luego su variación en presencia del patógeno, las columnas de filogramas muestran diferentes niveles taxonómicos analizados por los artículos.

\* Clados que incrementan en presencia del patógeno.

**Tabla 3.** Diversidad Alpha según manejo agronómico en estado sano

Organismo	Manejo agronómico	Shannon	Chao1	InvSimpson	Evennes
Bacterias	Orgánico	2.20	160.00	5.62	0.47
	Convencional	1.95	235.44	4.22	0.41
Hongos	Orgánico	3.52	134.00	16.50	0.71
	Convencional	1.54	38.00	2.85	0.42

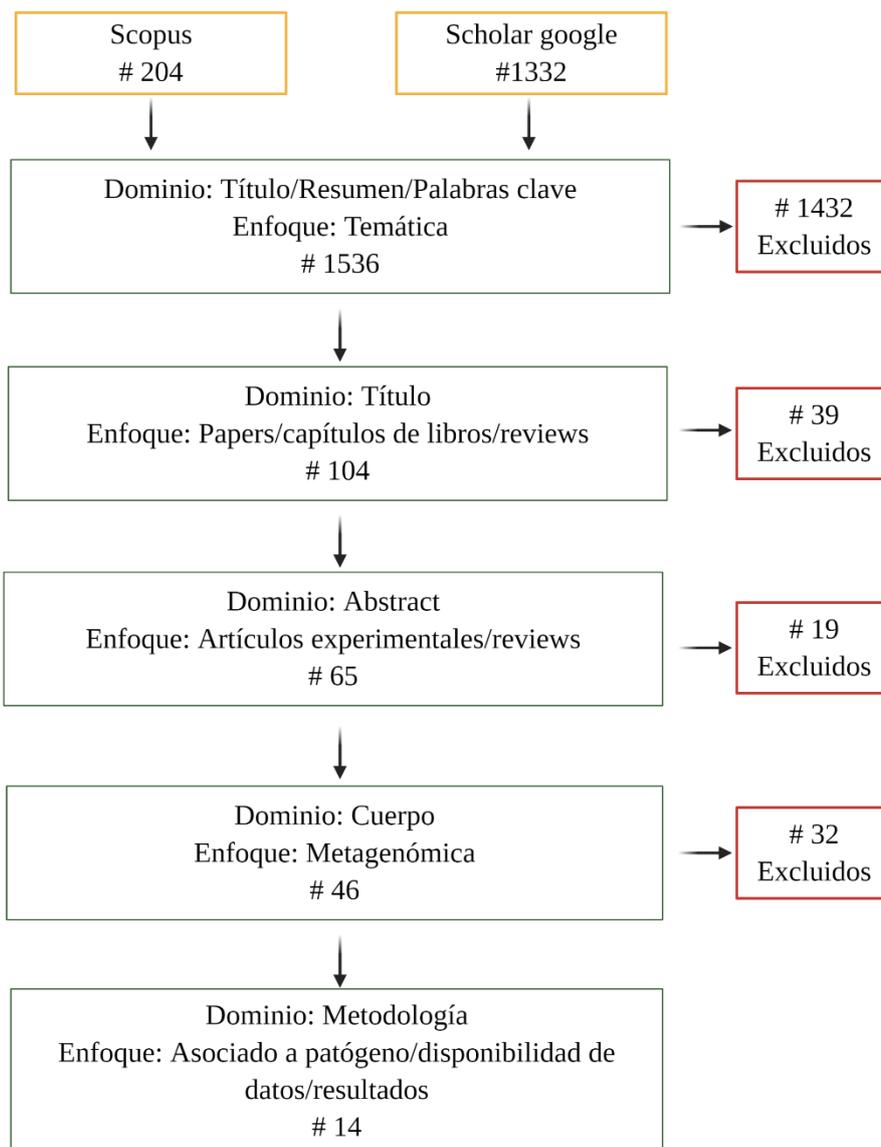
Se analizan 4 parámetros de diversidad alpha lo que sugiere que el sistema de manejo agronómico orgánico es el más diverso independientemente del sistema de manejo agronómico.

**Tabla 4.** Diversidad Alpha según manejo agronómico en presencia de *P. fijiensis*

Organismo	Manejo agronómico	Estado	Shannon	Chao1	InvSimpson	Evennes
Bacterias	Orgánico	Sano	2.20	160.00	5.62	0.47
		Enfermo	1.50	60.56	2.92	0.38
	Convencional	Sano	1.95	235.44	4.22	0.41
		Enfermo	1.97	179.38	3.63	0.40
Hongos	Orgánico	Sano	3.52	134.00	16.50	0.71
		Enfermo	1.63	31.00	2.22	0.47
	Convencional	Sano	1.54	38.00	2.85	0.42
		Enfermo	3.21	31.00	22.00	0.93

El microbioma bacteriano responde disminuyendo su diversidad en presencia del patógeno, mientras que el fúngico responde diferente dependiendo del sistema de manejo agronómico. En el microbioma de la hoja de banano orgánica disminuye la diversidad, mientras que en el convencional aumenta.

## FIGURAS



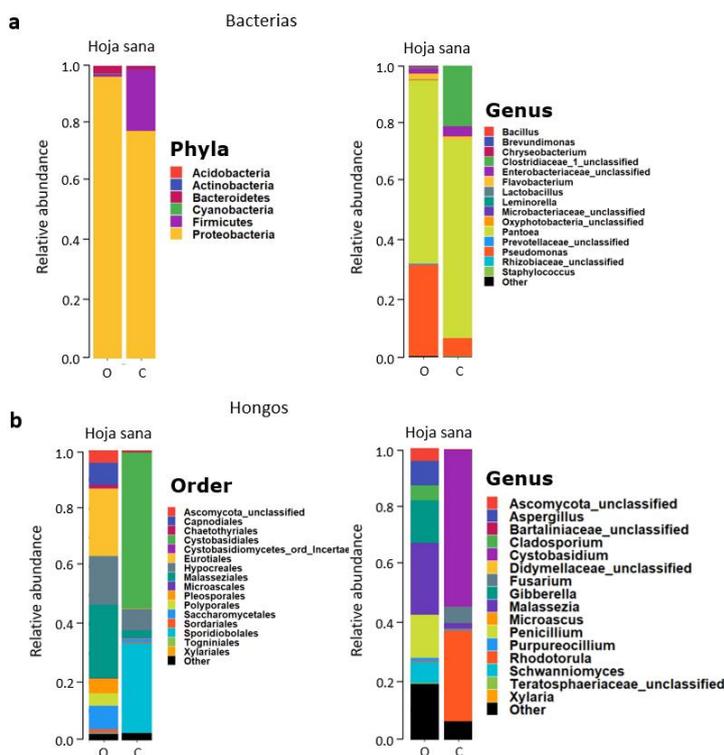
**Figura 1.** Esquema de filtros realizados para la revisión sistemática de literatura

La figura muestra la cantidad total de artículos para cada motor de búsqueda obteniendo un total de 1536 artículos que se seleccionaron progresivamente bajo los criterios especificados hasta obtener un total de 14 artículos como mejores hallazgos basados en resultados para hacer comparaciones.



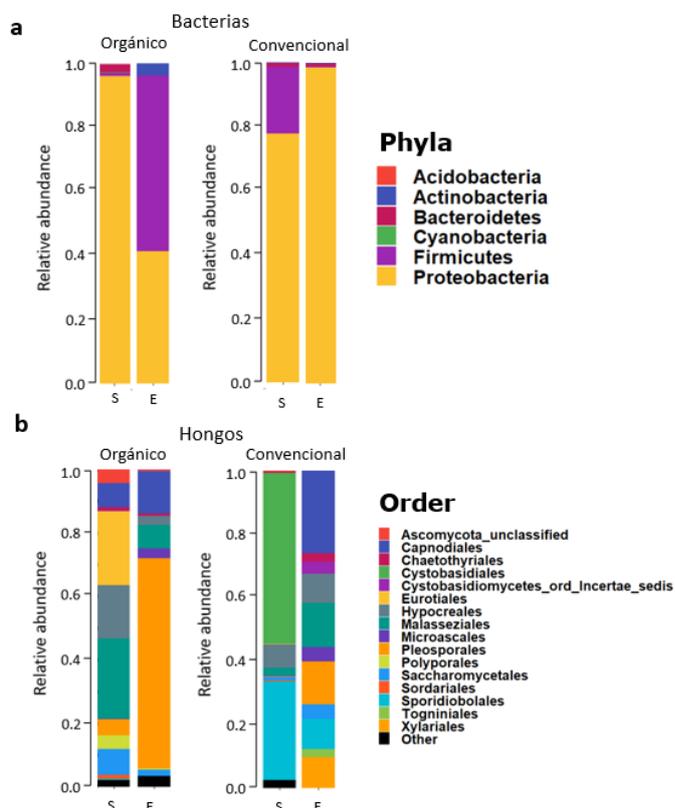
**Figura 2.** Clasificación general de los mejores 46 artículos escogidos

Artículos escogidos en base al cuerpo entre el año 2014 y 2020, se seleccionan en diferentes categorías, detalle en el **Anexo A**.



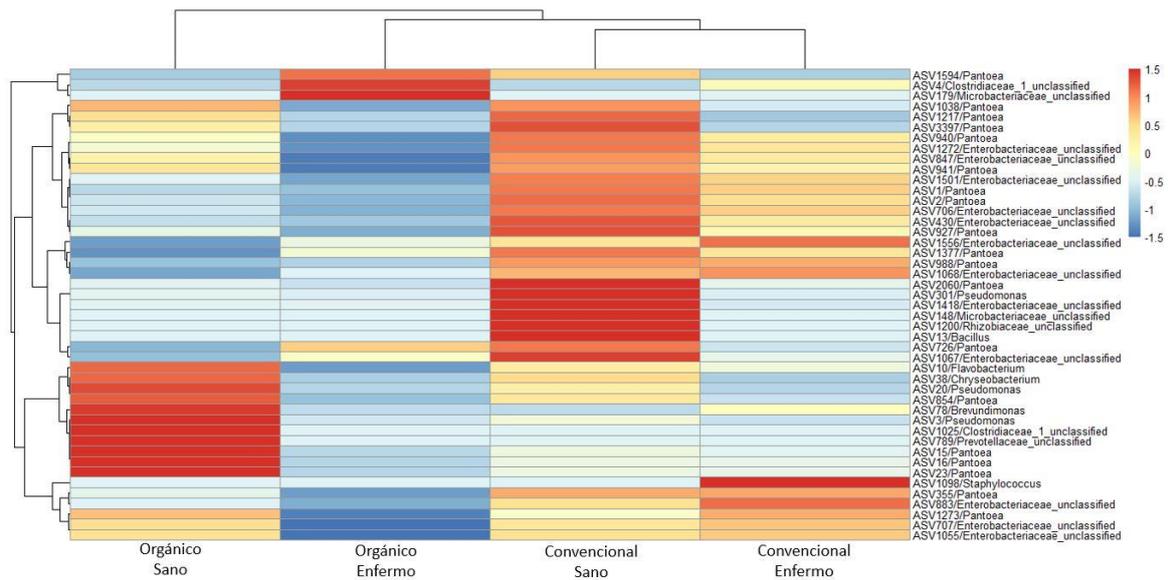
**Figura 3.** Composición filogenética de hojas de banano en estado basal (a) del gen 16S rRNA (V3-V4) y (b) de la región ITS.

La hoja del sistema de manejo convencional presenta mayor abundancia de Firmicutes y menor abundancia de Proteobacterias comparado con el orgánico. En general, el filo más abundante es Proteobacteria. La comunidad fúngica del sistema de manejo orgánico presenta mayor uniformidad, mientras que el convencional está dominado por los órdenes Cystobasidiales y Sporidiobolales.



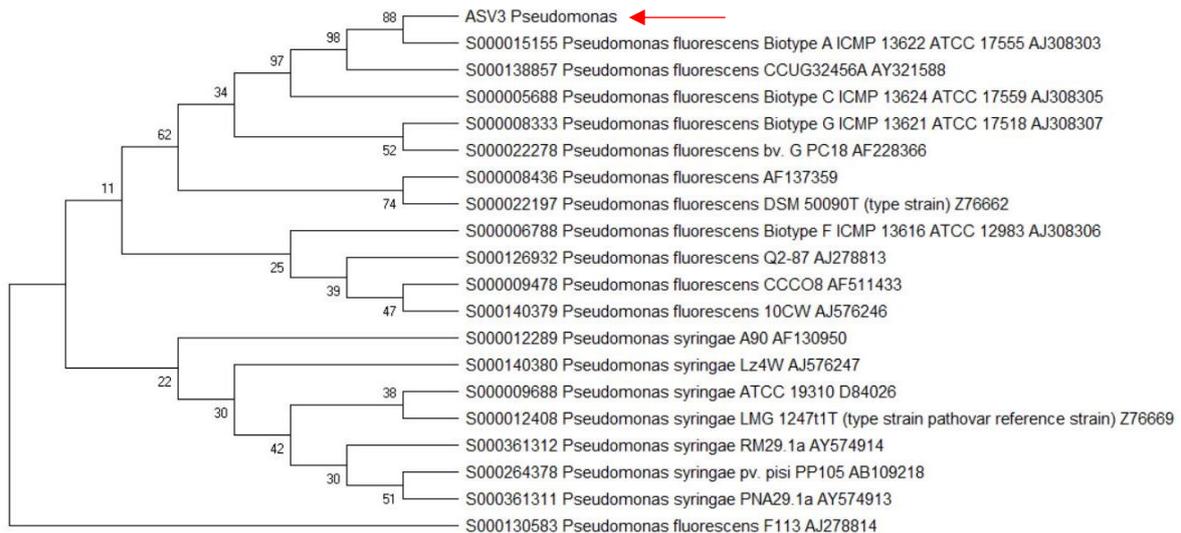
**Figura 4.** Cambio en composición filogenética en presencia de *P. fijiensis* (a) para el gen 16S rRNA y (V3-V4) y (b) la región ITS.

La respuesta de la composición filogenética del microbioma bacteriano es contraria en los sistemas de manejo, en términos de proporción de los filos Firmicutes y Proteobacteria. La comunidad fúngica del sistema de manejo orgánico se ve dominada por el orden Cystobasidiales en presencia del patógeno, mientras que el convencional se vuelve más uniforme.



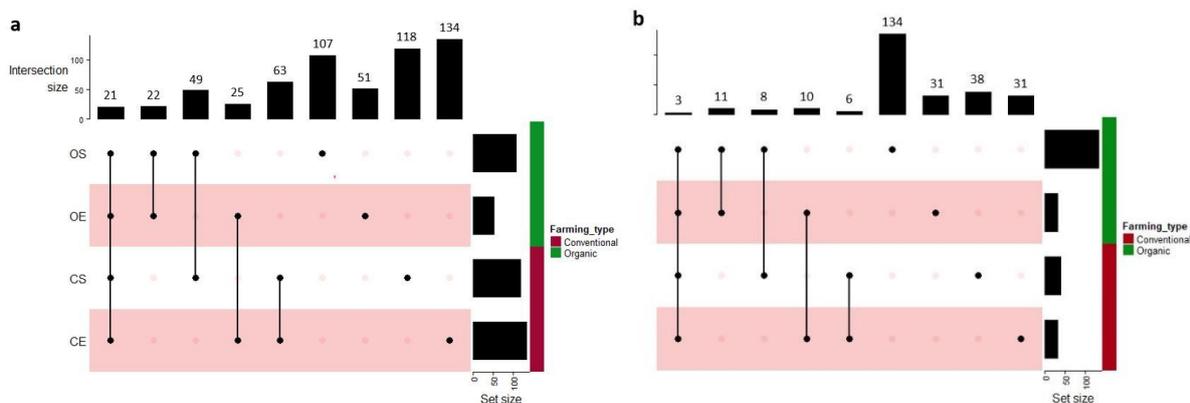
**Figura 5.** Heatmap planteado con ASVs de muestras bacterianas. El gráfico muestra el enriquecimiento diferencial de ASVs dependiendo del estado de salud y el manejo agronómico.

Los ASVs bacterianos incrementan de manera diferencial dependiendo del sistema de manejo y del estado de salud de la hoja. Los ASVs incrementados en la muestra orgánica sana son de interés para prospección.



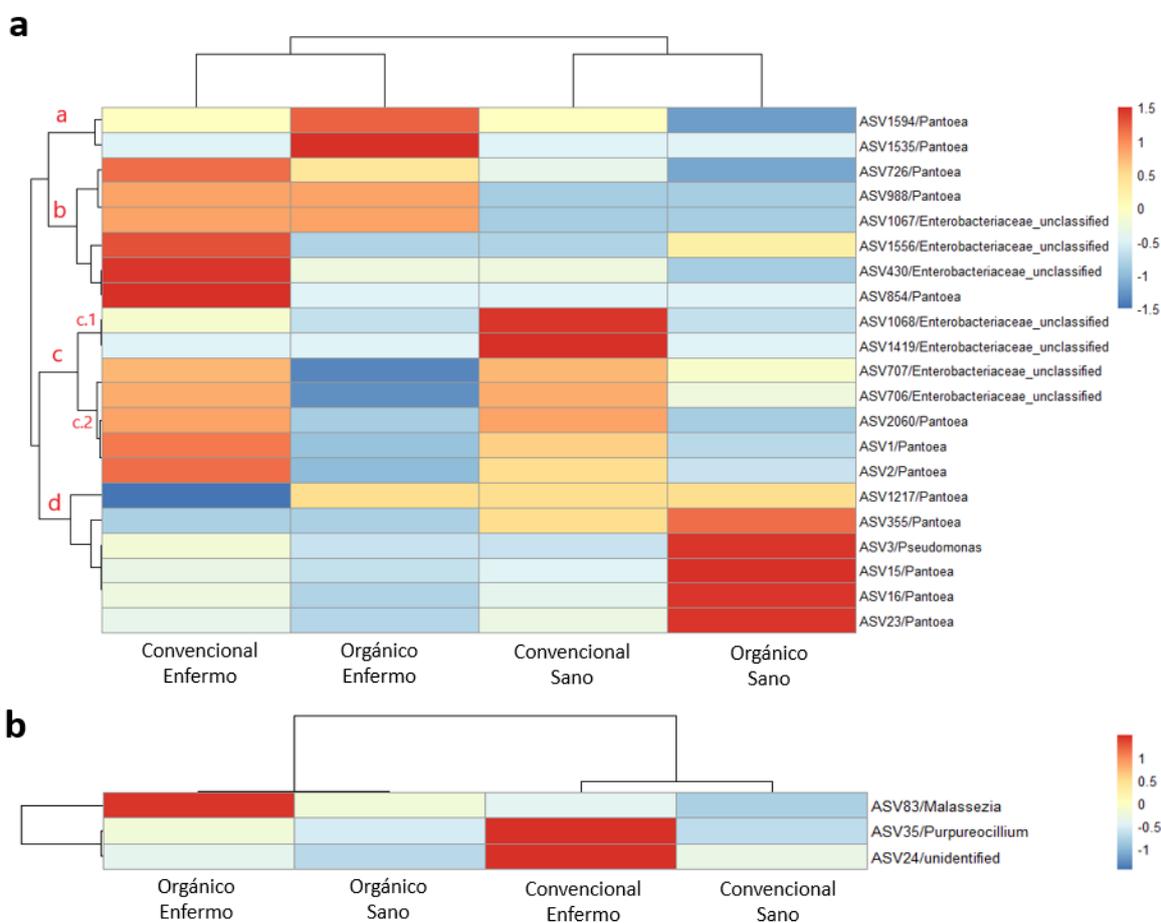
**Figura 6.** Árbol filogenético realizado con Maximum Likelihood entre el ASV3\_Pseudomonas, *P. fluorescens* y *P. syringae*.

El árbol filogenético se realiza con el modelo Namura Tei y el método Maximum Likelihood usando un Bootstrap de 10000. El ASV3 de interés se ubica dentro del caldo de *Pseudomonas fluorescens*.



**Figura 7.** Riqueza de ASVs por muestra y compartidos orgánico (O), convencional (C), sano (S) y enfermo (E) para **(a)** bacterias y **(b)** hongos.

El core microbiome está compuesto por 21 ASVs bacterianos y 3 ASVs fúngicos. En cuanto a hongos, la hoja orgánica sana posee una riqueza mayor en comparación con las demás muestras.



**Figura 8.** Heatmap plotado con el core microbiome **(a)** bacteriano correspondiente a 21 ASVs y **(b)** fúngico correspondiente a 3 ASVs.

El core bacteriano se muestra dominado por el género *Pantoea* sp. y géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, mostrando clusters definidos para cada muestra y agrupándose por estado de salud. El core fúngico muestra agrupación por manejo agronómico.

## REFERENCIAS

- Adhikari, A., Nandi, S., Bhattacharya, I., Roy, M. De, Mandal, T., & Dutta, S. (2015). Phylogenetic analysis based evolutionary study of 16S rRNA in known *Pseudomonas* sp. *Bioinformatics*, *11*(10), 474–480. <https://doi.org/10.6026/97320630011474>
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, *57*(3), 175–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.010>
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological Control Agents Against Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., Paasch, B. C., Ma, L., Kremer, J., Cheng, Y., Zhang, L., Wang, N., Wang, E., Xin, X. F., & He, S. Y. (2020). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature*, *580*(7805), 653–657. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2185-0>
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, *12*(4), 307–328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>
- Evans, E., & Ballen, F. (2018). Banana Market. *University of Florida. IFAS Extension*, 1–9.

<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FE/FE90100.pdf>

- Finkel, O. M., Salas-González, I., Castrillo, G., Spaepen, S., Law, T. F., Teixeira, P. J. P. L., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2019). The effects of soil phosphorus content on plant microbiota are driven by the plant phosphate starvation response. *PLOS Biology*, *17*(11), 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000534>
- Fu, L., Penton, C. R., Ruan, Y., Shen, Z., Xue, C., Li, R., & Shen, Q. (2017). Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. *Soil Biology and Biochemistry*, *104*, 39–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.008>
- Gdanetz, K., & Trail, F. (2017). The wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection. *Phytobiomes Journal*, *1*(3), 158–168. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-05-17-0023-R>
- Griffiths, S. M., Galambao, M., Rowntree, J., Goodhead, I., Hall, J., O’Brien, D., Atkinson, N., & Antwis, R. E. (2020). Complex associations between cross-kingdom microbial endophytes and host genotype in ash dieback disease dynamics. *Journal of Ecology*, *108*(1), 291–309. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13302>
- Gu, Z. (2020). *ComplexHeatmap Complete Reference*. ComplexHeatmap Complete Reference. <https://jokergoo.github.io/ComplexHeatmap-reference/book/>
- Hesse, C., Schulz, F., Bull, C. T., Shaffer, B. T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K. A., Varghese, N., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I. T., Kyrpides, N., Woyke, T., & Loper, J. E. (2018). Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, *20*(6), 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>
- Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2020). Insect herbivory reshapes a native leaf

- microbiome. *Nature Ecology and Evolution*, 4(2), 221–229.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-019-1085-x>
- Jiao, J.-Y., Wang, H.-X., Zeng, Y., & Shen, Y.-M. (2006). Enrichment for microbes living in association with plant tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 830–837.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02830.x>
- Joshi, N., & Sickle, F. (2011). *No Title*. A Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files (Version 1.33). <https://github.com/najoshi/sickle>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *The Arabidopsis Book*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Kimunye, J. N., Muzhinji, N., Mostert, D., Viljoen, A., van der Merwe, A. E., & Mahuku, G. (2020). Genetic Diversity and Mating Type Distribution of *Pseudocercospora fijiensis* on Banana in Uganda and Tanzania. *Phytopathology*®. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0138-R>
- Köberl, M., Dita, M., Martinuz, A., Staver, C., & Berg, G. (2015). Agroforestry leads to shifts within the gammaproteobacterial microbiome of banana plants cultivated in Central America. *Frontiers in Microbiology*, 6, 91.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00091>
- Kolde, R. (2019). *pheatmap: Pretty Heatmaps*. Pheatmap: Pretty Heatmaps. <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>
- Li, P., Xu, J., Wang, Z., & Li, H. (2020). *Phyllosphere Microbiome in Response to Citrus Melanose*. 1–26. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-51076/v1>
- Liu, H., Brettell, L. E., & Singh, B. (2020). Linking the Phyllosphere Microbiome to Plant Health. *Trends in Plant Science*, 25(9), 841–844.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.06.003>

Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>

Liu, Y., Zhu, A., Tan, H., Cao, L., & Zhang, R. (2019). Engineering banana endosphere microbiome to improve Fusarium wilt resistance in banana. *Microbiome*, 7(1), 74.

<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0690-x>

Lu-Irving, P., Harenčár, J. G., Sounart, H., Welles, S. R., Swope, S. M., Baltrus, D. A., & Dlugosch, K. M. (2019). Native and Invading Yellow Starthistle (*Centaurea solstitialis*) Microbiomes Differ in Composition and Diversity of Bacteria. *MSphere*, 4(2).

<https://doi.org/10.1128/mSphere.00088-19>

Luo, L., Zhang, Z., Wang, P., Han, Y., Jin, D., Su, P., Tan, X., Zhang, D., Muhammad-Rizwan, H., Lu, X., & Liu, Y. (2019). Variations in phyllosphere microbial community along with the development of angular leaf-spot of cucumber. *AMB Express*, 9(1).

<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0800-y>

Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Guzmán-González, S., Leopardi-Verde, C. L., & Canto-Canché, B. (2019). Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico. *Plant Pathology*, 68(3), 513–522. <https://doi.org/10.1111/ppa.12965>

Mengist, W., Soromessa, T., & Legese, G. (2020). Method for conducting systematic literature review and meta-analysis for environmental science research. *MethodsX*, 7,

100777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.100777>

- Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., Pindo, M., & Pertot, I. (2014). Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(12), 3585–3596. <https://doi.org/10.1128/AEM.00415-14>
- 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. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Purahong, W., Orrù, L., Donati, I., Perpetuini, G., Cellini, A., Lamontanara, A., Michelotti, V., Tacconi, G., & Spinelli, F. (2018). Plant microbiome and its link to plant health: Host species, organs and pseudomonas syringae pv. Actinidiae infection shaping bacterial phyllosphere communities of kiwifruit plants. *Frontiers in Plant Science*, *871*(November), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01563>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Selvaraj, S., Ganeshamoorthi, T., Anand, T., Raguchander, N., Seenivasan, R., & Samiyappan, R. (2014). Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Helicotylenchus multicinctus* in banana plantation. *BioControl*, *3*.
- Smets, W., & Koskella, B. (2020). Microbiome: Insect Herbivory Drives Plant Phyllosphere Dysbiosis. *Current Biology*, *30*(9), R412–R414.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.039>

- 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. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews. Microbiology*, *10*(12), 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Wagner, M. R., Busby, P. E., & Balint-Kurti, P. (2020). Analysis of leaf microbiome composition of near-isogenic maize lines differing in broad-spectrum disease resistance. *New Phytologist*, *225*(5), 2152–2165. <https://doi.org/10.1111/nph.16284>
- Xue, C., Ryan Penton, C., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y., & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific Reports*, *5*(1), 11124. <https://doi.org/10.1038/srep11124>
- Yourstone, S. M., Lundberg, D. S., Dangl, J. L., & Jones, C. D. (2014). *MT-Toolbox : improved amplicon sequencing using molecule tags*. 1–7.
- Zhang, Z., Kong, X., Jin, D., Yu, H., Zhu, X., Su, X., Wang, P., Zhang, R., Jia, M., & Deng, Y. (2019). *Euonymus japonicus* phyllosphere microbiome is significantly changed by powdery mildew. *Archives of Microbiology*, *201*(8), 1099–1109. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01683-3>
- Zhang, Z., Luo, L., Tan, X., Kong, X., Yang, J., Wang, D., Zhang, D., Jin, D., & Liu, Y. (2018). Pumpkin powdery mildew disease severity influences the fungal diversity of the phyllosphere. *PeerJ*, *2018*(4), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.4559>

## ANEXOS

## ANEXO A: ARTÍCULOS SELECCIONADOS PARA CLASIFICACIÓN GENERAL Y DETALLES

Año	First author	Species	Plant organ	Microbiome	Analysis	Pathogen	Pathogen life-style	Experiment type	Location
2014	Perazzolli	Grapevine	Phyllosphere	Epiphytes	Health	Conv. Vs. Org (Healthy)	-	Bio-essay	Field
2014	Bodenhausen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	SynCom	-	Bio-essay	In vitro
2016	Ritpitakphong	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	<i>B. cinerea</i>	Necrotrophic	Bio-essay	Greenhouse
2016	Vogel	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	Transcriptome in <i>Pseudomonas syringae</i>	Biotrophic	Bio-essay	Greenhouse
2016	Allard	Tomato	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Amendment	-	Bio-essay	Field
2016	Otesen	Tomato	Phyllosphere	Endophytes	Health	Diversity	-	Bio-essay	Field
						Host species identity, site and time drive			
2016	Laforest-Lapointe	Various	Phyllosphere	Epiphytes	Health	temperate	-	Samples	Field
2016	Laforest-Lapointe2	Various	Phyllosphere	Epiphytes	Health	Variation	-	Samples	Field
2017	Gdanetz	Wheat	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	Disease protection	-	Samples	Field
2017	Whitaker	Asteraceae	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Feedback	-	Bio-essay	Greenhouse
2017	Wassermann	Brassica	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Health	-	Samples	Field
2017	Thapa	Arroz	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Nutrition	-	Samples	Field
2017	Laforest-Lapointe	Various	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Plant diversity	-	Bio-essay	Field
2018	Purahong	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward y <i>A. chinensis</i> cv. Hort16A	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	<i>Pseudomonas syringae</i>	Hemibiotrophic	Samples	Field
2018	Berg	Tomato	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	Bacterial speck ( <i>Pseudomonas syringae</i> )	Biotrophic	Bio-essay	Greenhouse
2018	Zhang	Pumpkin ( <i>C. moschata</i> : nenzao1)	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	Powdery Mildew	Biotrophic	Samples	Field
2018	Wallace	Maize	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Descriptive	-	Bio-essay	Field
2018	Taudière	Corsican pine	Phyllosphere	Endophytes	Health	Diversity of ascomycetes	-	Samples	Field
2018	Qian	Mussaenda pubescens var. Alba	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Nutrition	-	Samples	Field
2018	Carlstrom	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	SynCom (keystone species)	-	Bio-essay	In vitro
2019	Seybold	Wheat	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Necrotrophic	Bio-essay	Greenhouse
2019	Luo	Cucumber	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Lachrymans	Hemibiotrophic	Bio-essay	Field
2019	Wagner	Maize	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	Disease resistance	Hemibiotrophic	Samples	Field
2019	Griffiths	Ash tree	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	<i>H. fraxineus</i>	Hemibiotrophic	Samples	Field
2019	Hu	Wheat	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	<i>Septoria tritici</i> blotch and yellow leaf spot	Hemibiotrophic	Bio-essay	Field
2019	Bruisson	Grapevine	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes	Disease	<i>Botrytis cinerea</i> and <i>Phytophthora infestans</i>	Biotrophic	Bio-essay	In vitro
2019	Nerva	Grapevine	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	<i>Erysiphe necator</i>	Biotrophic	Bio-essay	Greenhouse
2019	Zhang	<i>Eaonymus japonicus</i>	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	<i>Erysiphe</i> sp.	Biotrophic	Samples	Field
2019	Toju	Tomato	Phyllosphere	Endophytes	Health	Association	-	Bio-essay	Greenhouse
2019	Cernava	<i>Té (Camelia sinensis (L.))</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Conv. Vs. Org (Healthy)	-	Samples	Field
2019	Beilsmith	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes	Health	GWAS	-	Bio-essay	-
2019	Darlison	Spinach and Rocket	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Mineral content	-	Bio-essay	Field
2020	Humphrey	<i>Cardamine cordifolia</i>	Phyllosphere	Endophytes	Disease	Insect ( <i>S. nigrita</i> )	Necrotrophic	Samples	Field
2020	Chen1	Tobacco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Phyllosphere	Endophytes	Disease	<i>Rhizopus oryzae</i>	Necrotrophic	Samples	Field
2020	Seybold	Wheat	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Necrotrophic	Bio-essay	Greenhouse
2020	Ulrich	Native ash	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes	Disease	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Hemibiotrophic	Samples	Field
2020	O'keeffe	<i>Lolium arundinaceum</i>	Phyllosphere	Endophytes	Disease	Parasite	Biotrophic, necrotrophic, hemibiotrophic	Samples	Field
2020	Eitzen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	<i>Albugo laibachii</i>	Biotrophic	Bio-essay	In vitro
2020	Tao	Apple	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Disease	<i>Gymnosporangium yamadae</i>	Biotrophic	Samples	Field
2020	Karasov	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes	Disease	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	Biotrophic	Bio-essay	In vitro
2020	Li	Citrus	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes	Disease	Melanose ( <i>Diaporthe citri</i> )	Biotrophic	Samples	Field
2020	Burke	<i>Fagus grandifolia</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes	Disease	Nematode ( <i>Litylenchus crenatae</i> )	Biotrophic	Samples	Field
2020	Perazzolli	Grapevine	Phyllosphere	Epiphytes	Disease	<i>Plasmodiopsis viticola</i> and <i>Erysiphe necator</i>	Biotrophic	Bio-essay	Field
2020	Doan	Various	Phyllosphere	Epiphytes	Health	Microbial dispersion	-	Bio-essay	Greenhouse
2020	Miebach	<i>Arabidopsis thaliana (Col-0)</i>	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Microbiome interactions	-	Bio-essay	Greenhouse
2020	Jean	<i>Hylocomium splendens</i> and <i>Pleurozium schreberi</i> .	Phyllosphere	Epiphytes and endophytes (together)	Health	Nitrogen fixation	-	Samples	Field