

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Caracterización del microbioma en el cultivo de banano (*Musa × paradisiaca* L.) bajo sistema de producción orgánico y convencional**

**Claudia Giselle Zapata Ramón**

**Ingeniería en Biotecnología**

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

Quito, 14 de mayo de 2021

# UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

## HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Caracterización del microbioma en el cultivo de banano (*Musa × paradisiaca* L.) bajo sistema de producción orgánico y convencional**

**Claudia Giselle Zapata Ramón**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León, PhD**

Quito, 14 de mayo de 2021

## © 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: Claudia Giselle Zapata Ramón

Código: 00138377

Cédula de identidad: 1724976020

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

## **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## **UNPUBLISHED DOCUMENT**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

En los últimos años se ha propuesto una agricultura orgánica para mitigar el impacto sobre el ambiente provocado por la agricultura convencional, pero los efectos de los diferentes sistemas de gestión agrícola en la respuesta de las comunidades microbianas son poco conocidos. Este estudio informa sobre la estructura y diversidad de la comunidad microbiana del suelo, rizosfera y hoja de las plantas de banano (*Musa paradisiaca*) bajo manejo orgánico y convencional. En la revisión sistemática de literatura se encontró que el efecto del sistema agrícola actúa de forma significativa sobre la composición y estructura del microbioma, pero su efecto sobre la diversidad cambia en función de otras variables. Para la fase experimental, las muestras se obtuvieron de dos plantaciones bananeras ubicadas en la provincia de El Oro, Ecuador. El análisis se basó en la secuenciación de amplicones de la región V3-V4 del gen del ARNr 16S para bacterias e ITS2 para hongos. Se encontró una diferencia significativa entre los sistemas de manejo sobre la composición de la comunidad microbiana. En términos generales, bajo un sistema de manejo convencional, la diversidad de la comunidad bacteriana y fúngica aumentó en el suelo y rizosfera. El suelo y la rizosfera bajo agricultura orgánica exhibieron una sobrerrepresentación de géneros microbianos que se sabe que juegan un papel importante en la supresión de patógenos. También se encontró que los microorganismos (ASV) del mismo género responden de manera diferente a los dos tipos de manejo agrícola en el suelo y la rizosfera, mientras que las comunidades bacterianas en las hojas fueron más similares en ambos tipos de manejo. Comprender cómo los sistemas de gestión de cultivos a largo plazo modifican la diversidad y la estructura microbiana a nivel de taxones microbianos individuales, como se presenta en esta investigación, puede ayudar a diseñar sistemas agrícolas que puedan mantener una alta rentabilidad de los cultivos de banano mediante la estimulación de bacterias promotoras del crecimiento y los responsables de la supresión de enfermedades transmitidas por el suelo.

**Palabras clave:** orgánico, convencional, microbioma, funciones ecosistémicas, diversidad.

## ABSTRACT

In recent years, organic agriculture has been proposed to mitigate the impact on the environment caused by conventional agriculture, but the effects of different agricultural management systems on microbial communities' response are poorly understood. This study reports on the structure and diversity of the microbial community of the soil, rhizosphere and leaf of banana plants (*Musa paradisiaca*) under organic and conventional management. In the systematic literature review, it was found that the effect of the agricultural system acts significantly on the composition and structure of the microbiome, but its effect on diversity changes depending on other variables. For the experimental phase, the samples were obtained from two banana plantations located in the province of El Oro, Ecuador. The analysis was based on amplicon sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene for bacteria and ITS2 for fungi. It was found a significant difference on the composition of the microbial community between the management systems. In general terms, under a conventional management system, the diversity of the bacterial and fungal community increased in the soil and rhizosphere. The soil and rhizosphere under organic agriculture exhibited an over-representation of microbial genera that are known to play an important role in pathogen suppression. It was also found that the microorganisms (ASV) of the same genus respond differently to the two types of agricultural management in the soil and the rhizosphere, while the bacterial communities in the leaves were more similar in both types of management. Understanding how long-term crop management systems modify microbial diversity and structure at the level of individual microbial taxa, as presented in this research, can help us to design agricultural systems that can maintain high profitability of banana crops through stimulation of growth promoting bacteria and those responsible for the suppression of soil-borne diseases.

**Keywords:** organic, conventional, microbiome, ecosystem functions, diversity.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Revisión sistemática de literatura.....	15
Selección de sitio y recolección de muestras .....	15
Procesamiento de muestras y extracción de ADN .....	16
Preparación de las librerías y secuenciamiento.....	16
Análisis bioinformático .....	17
Análisis estadísticos .....	17
RESULTADOS.....	18
Efecto de las diferentes prácticas agrícolas en la composición del microbioma: Revisión sistemática. ....	18
Efecto de los diferentes órganos de la planta y regímenes de fertilización sobre la diversidad alfa. ....	19
Efecto de los diferentes órganos de la planta y regímenes de fertilización sobre la diversidad beta.....	19
Composición de bacterias y hongos en las diferentes órganos de la planta analizados y manejos agrícolas .....	20
DISCUSIÓN .....	22
El efecto del manejo agrícola sobre los microorganismos varía en la literatura.....	22
El órgano de la planta y manejo agrícola son factores importantes para la estructuración del microbioma.....	22
El manejo agrícola convencional favorece a la diversidad microbiana .....	23
El tipo de manejo agrícola tiene un efecto significativo sobre la composición microbiana	24
CONCLUSIONES .....	26
TABLAS .....	27
FIGURAS .....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS .....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de $\alpha$ -diversidad para la comunidad de bacterias determinados para los dos tipos de manejo dentro de cada fracción.....	27
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de $\alpha$ -diversidad para la comunidad de hongos determinados para los dos tipos de manejo dentro de cada fracción.....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapas solares del análisis de los estudios incluidos en la revisión sistemática. .28	
<b>Figura 2.</b> Efecto del tipo de la fracción y tipo de manejo en la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas. ....29	
<b>Figura 3.</b> Cambios en la comunidad microbiana en los diferentes fracciones de la planta analizadas asociados a diferentes tipos de manejo. ....30	
<b>Figura 4.</b> Cambios en la comunidad microbiana en los diferentes fracciones de la planta analizadas asociados a diferentes tipos de manejo. ....31	
<b>Figura 5.</b> Heatmap de la tabla ASVs bacterianas. ....32	
<b>Figura 6.</b> Heatmap de la tabla ASVs de hongos. ....33	

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA EL SCREENING LOS ESTUDIOS ENCONTRADOS PARA LA REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA .....	39
ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA RECUPERACIÓN DE ENDÓFITOS DE LA HOJA .....	40
ANEXO 3. DETALLE DE LA CONCENTRACION DE LOS REACTIVOS USADOS PARA LA PCR PREVIO A LA SECUENCIACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS .....	41
ANEXO 4. DETALLE DE LOS CICLOS DE LA PCR PREVIA AL SECUENCIAMIENTO PARA BACTERIAS Y HONGOS .....	42

## INTRODUCCIÓN

Gracias a las tecnologías, industrialización y globalización de la agricultura en la revolución verde la productividad mejoró significativamente creciendo más del triple entre 1969 y 2015 y se dio una expansión del uso de la tierra y recursos naturales destinados a agricultura. Sin embargo, a pesar de dichas mejoras en la eficiencia agrícola, el rendimiento se ha empezado a ralentizar lo que puede dificultar el crecimiento de la producción para alimentar a una población en aumento (FAO, 2017; Khush, 1999).

Según la FAO (2017), para el 2050 la población humana mundial alcanzará los 9700 millones de personas, dicho crecimiento perjudicará las perspectivas de desarrollo. Si bien las comunidades locales depende de la agricultura como fuente de empleo e ingresos, se cree que esta no se puede desarrollar más por la presión a la que se encuentran sometidas las tierras y los recursos hídricos (Paul et al., 2014).

Por otro lado, el cultivo de banana es una de las actividades agrícolas de mayor importancia para la economía y seguridad alimentaria de varios países incluido el Ecuador. En el 2019 la superficie cosechada de banano en Ecuador fue de 183 mil hectáreas, siendo las provincias de Los Ríos, El Oro y Guayas que suman el 84% de la superficie total cosechada de éste producto. Durante el 2019, el país exportó cerca de 6,6 millones de toneladas (FAOSTAT, s.f; Márquez, 2020).

Este cultivo, se ve constantemente amenazado por diversos problemas fitosanitarios, algunos de ellos muy serios por las consecuencias que sufren los productores en el aspecto económico y de productividad. Para combatir dichas amenazas se ha empleado fungicidas protectantes como mancozeb o clorotalonil así como sistémicos como benzimidazoles, triazoles, morfolinás y estrobilurinas, los cuales se distribuyen en las plantaciones con ayuda de avionetas (Marin et al., 2003). El aumento del uso de estos químicos junto con el aporte de fertilizantes químicos ha contribuido a aumentar la productividad del cultivo de banano. Sin

embargo, existe una creciente preocupación sobre los impactos negativos sobre el ambiente y salud de los trabajadores.

El sector agrícola y alimenticio contribuyen significativamente a las emisiones de gases de efecto invernadero, y cada año estos alcanzan niveles más altos, y las previsiones muestran que seguirán aumentando hasta el 2050 (FAO, 2017; Gruber y Galloway, 2008).

Adicionalmente el manejo convencional ha estado involucrado en contaminación de aguas subterráneas, pérdida de biodiversidad y deterioro de la función del suelo (Yin et al., 2014).

Es por esto que actualmente se busca lograr una transición hacia una agricultura más eficiente reduciendo los impactos sobre el ambiente. Las prácticas de conservación de los recursos como la agricultura orgánica y climáticamente inteligente, así como mejoramiento genético constituyen nuevos métodos para lograrlo (Evenson y Gollin, 2003). En Ecuador, en el 2018 el banano orgánico representó el 7.2% de las exportaciones y para el 2020 este aumentó a 10%. En este contexto las exigencias sanitarias de diferentes países y la tendencia saludable que cada día toma más fuerza entre los consumidores, han permitido el crecimiento de la demanda del banano orgánico en el mundo (Agrocalidad, 2020). Sin embargo, aún se necesita una visión más amplia sobre todos los componentes de los sistemas de producción.

Actualmente se ha empezado a estudiar el rol de las comunidades microbianas, antes ignorado en la agricultura. Se conoce que estos están involucrados en una serie de servicios ecosistémicos modulando el ciclo de nutrientes e interacciones simbióticas y patógenas con las plantas, por lo que su rol en la productividad de los agroecosistemas es esencial (Bahram et al., 2018; Bardgett, R. y Van Der Putten, W. (2014). Varios estudios han demostrado que la intensificación agrícola puede afectar al microbioma asociado a las plantas y como consecuencia a su rol ecosistémico (Pershina et al., 2015; Bakker et al., 2018). Dada la importancia de los microorganismos en una agricultura sostenible, explorar la diversidad y la

estructura microbiana inducido por prácticas agrícolas puede contribuir a entender de mejor forma los procesos ecosistémicos para desarrollar sistemas de agricultura sostenible.

Los rápidos avances en las tecnologías de secuenciación masiva presentan grandes oportunidades para el estudio y comprensión de microbiomas en una diversa gama de entornos desde perspectivas más amplias (Clooney et al., 2016) las ventajas de estas tecnologías permiten detectar una gran proporción de microorganismos cultivables y no cultivables, lo que ha facilitado a los investigadores obtener mayor conocimiento sobre la ecología microbiana. La secuenciación de amplicones, en este caso 16s rDNA e ITS2, ha jugado un papel clave en la comprensión de la composición taxonómica microbiana (Cao et al., 2017). Para determinar dicha taxonomía en base a amplicones, uno de los primeros pasos es generar ASVs (por sus siglas en inglés “Amplicon Sequence Variant”), que son secuencias de ADN únicas recuperadas de la secuenciación. Los ASVs nos permite diferenciar la variación entre secuencias mediante un único cambio de nucleótidos, así estos se utilizan para clasificar grupos de especies según dicha secuencia encontrando variaciones biológicas y ambientales para finalmente determinar patrones ecológicos (Callahan et al., 2017).

La diversidad en un hábitat es el componente más utilizado en la caracterización de comunidades. Esta contempla tanto la riqueza de especies como la uniformidad. Chao1 e Inverso de Simpson cuantifican el número de individuos por muestra, es decir, la riqueza asumiendo que la comunidad es uniforme. Los índices de equidad, como es Evenness, dan la abundancia relativa de diferentes especies de una comunidad en términos de su distribución. Una comunidad, en la que las especies tienen el mismo número de individuos de diferentes especies, tendrá un índice de uniformidad más alto. Por otro lado, una comunidad dominada por una o pocas especies en términos de número de individuos, tendrá un índice de uniformidad más bajo (Thukral, 2017).

Los objetivos de este estudio son determinar patrones de cambios en el microbioma bajo diferentes sistemas agrícolas reportados en la literatura por medio de una revisión sistemática, para posteriormente realizar la caracterización del microbioma asociado a la rizósfera, suelo y hoja de plantas de banano en plantaciones en la provincia del Oro bajo sistema de producción orgánico y convencional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Revisión sistemática de literatura

La pregunta de investigación fue: ¿Cuál es la influencia del tipo de manejo en el ensamblaje y diversidad del microbioma de las plantas? Se utilizaron las bases de datos SCOPUS y ScienceDirect con los términos de búsqueda "Microbiome" AND "Organic management" OR "Conventional management" OR "Farming type" OR "Farming system" en el título, abstract y palabras clave. En los motores de búsqueda se filtró por lenguaje de interés: inglés, español y francés, se excluyeron revisiones, y se incluyó área de interés: agricultura y ciencias biológicas, microbiología, y genética y biología molecular. Se filtraron los estudios según el título y abstracts, y posteriormente según el texto completo, finalmente se realizó una búsqueda manual en Google Scholar (Guillemot, 2020; Jahan et al., 2016).

### Selección de sitio y recolección de muestras

El muestreo se llevó a cabo bajo el Contrato Marco MAE-DNB-CM-2018-0085 en mayo 2019 en dos haciendas localizadas en Santa Rosa, provincia de El Oro, distanciadas con 1.8 km. Las plantaciones de banano se establecieron en ambas haciendas hace aproximadamente sesenta años bajo manejo convencional. Hace cinco años la hacienda "Central, San José" (3°21'18.0"S 79°54'05.8"W) pasó a estar bajo manejo orgánico caracterizado por usar controladores biológicos, compostaje y fertilizantes orgánicos, mientras que la hacienda "Cueva" (3°21'33.7"S 79°54'58.3"W) se mantuvo bajo manejo convencional aumentando la frecuencia de aplicación de fertilizantes sintéticos a lo largo de los años hasta una vez al mes. Dentro de cada hacienda, se seleccionaron al azar dos plantas de banano. Las muestras de suelo se recolectaron de una ubicación aleatoria alrededor de la planta a una profundidad de 20 a 30 cm. Para las muestras de rizósfera, las raíces se retiraron del suelo con una pala a una profundidad de 10 a 15 cm. Para las muestras de las hojas, se seleccionó el tercio medio de la cuarta hoja. Todas las muestras se colocaron en bolsas de

polietileno y se guardaron en una nevera portátil hasta su transporte al laboratorio (Gamboa et al., 2003). Los diferentes órganos (hojas, rizósfera y suelo) se denominarán “fracciones”.

### **Procesamiento de muestras y extracción de ADN**

El protocolo para la obtención de los endófitos de las hojas se encuentra detallado en el **Anexo 2**. Para obtener la rizósfera, las raíces se colocaron en tubos Falcon con PBS, y se agitó en el vortex por 10 min. Se extrajeron las raíces del tubo y se centrifugó a 500 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se conservó a -20°C (Schmidt et al., 2020).

La extracción de ADN de bacterias y hongos, se realizó con el kit comercial DNeasy Powersoil® según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración y calidad del ADN se verificó con el fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) y electroforesis en gel de agarosa.

### **Preparación de las librerías y secuenciamiento**

Se amplificó la región V3–V4 16S rRNA usando los primers 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). En el extremo 5' se añadieron 2 barcodes y 6 cambios en marcos de lectura. Cada reacción de PCR se realizó por triplicado. El protocolo de PCR se realizó con las concentraciones de los reactivos y ciclos que se encuentran detallados en el **Anexo 3 y 4** (Finkel et al., 2019). Para la purificación de amplicones se usaron perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA) y se cuantificaron con el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para la amplificación de la región ITS se usaron los primers ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'). Las muestras de ADN se diluyeron a 3.5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . Se prepararon reacciones por triplicado con las concentraciones de los reactivos detallados en el **Anexo 3** y los ciclos de PCR en el **Anexo 4** (Finkel et al., 2019). Los productos de PCR fueron purificados con exonucleasas. Se realizó una segunda amplificación por triplicado con 3  $\mu\text{l}$  de los productos de PCR

purificados y primers con barcodes específicos para las muestras con las mismas condiciones de los ciclos (Finkel et al., 2019). Los amplicones fueron purificados con el kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

Los amplicones de bacterias y hongos se unieron en proporciones iguales y fueron diluidas a 10 pM por secuenciamiento, mismo que se llevó a cabo en la plataforma de Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) usando el kit 600-cycle V3 (Finkel et al., 2019).

### **Análisis bioinformático**

Se usó MT-Toolbox para eliminar adaptadores y cebadores, luego se filtraron en Sickle eliminando aquellas de baja calidad (Q scores < 20) y con lecturas menores a 1000. Las secuencias resultantes se colapsaron en ASVs con el paquete DADA2 en R v4.0.2. Para el análisis taxonómico se utilizó el método naïve Bayes kmer contra la base de datos Silva v132 generando finalmente la tabla de ASVs (Joshi y Sickle, 2011; Callahan et al., 2016). Las secuencias de la región ITS2 se procesaron usando DADA2 con los parámetros establecidos por defecto en las lecturas forward. Se utilizó la base de datos UNITE con el método naïve Bayes kmer usando el paquete MOTHR para la asignación taxonómica (Callahan et al., 2016).

### **Análisis estadísticos**

Se usaron los paquetes OhChibi y Vegan de R para calcular índices de diversidad. Se probó el efecto de la fracción sobre la composición microbianas usando PERMANOVA y se calculó la variación en la  $\beta$ -diversidad. Se realizó un análisis de componentes principales (CAP) para maximizar el efecto del tipo de manejo en base a las matrices de disimilitud Bray-Curtis y se contruyeron filogramas (Oksanen et al., 2016; Salas, 2019). Se realizó diagramas de Venn con el paquete VennDiagram para los dos tipos de manejo por cada fracción (Chen, 2018). Finalmente, se realizaron Heatmaps con los 40 ASVs más abundantes en los dos manejos en cada fracción usando el paquete Pheatmap (Kolde, 2019).

## RESULTADOS

### **Efecto de las diferentes prácticas agrícolas en la composición del microbioma: Revisión sistemática.**

Tomando los resultados de las dos bases de datos se obtuvieron 1409 estudios preliminares. En el **Anexo 1** se observa el criterio de selección para obtener los resultados de la revisión sistemática de literatura. Al filtrar, usando los criterios de exclusión, se obtuvieron 47 estudios. Posteriormente, se realizó una búsqueda manual en Google Scholar para recuperar estudios no contemplados en las dos primeras bases de datos. Se recopilaron 11 estudios para, en total, sumar 58 estudios incluidos en la revisión.

Al evaluar la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas, la mayoría de estudios (88% y 82% respectivamente) encontraron que estas difieren significativamente según el tipo de manejo agrícola aplicado. Dado que el efecto del microbioma de las partes de la planta (fracción) también se reportó como significativo, se analizó el efecto del tipo de manejo en cada órgano o fracción de la planta por separado.

Se encontró que 24 de los 54 estudios enfocados en la comunidad bacteriana del suelo y 8 de los 23 en la raíz reportan más diversidad de bacterias bajo manejo orgánico, mientras que 2 de los 5 estudios que analizan la parte aérea de la planta encontraron mayor diversidad bacteriana en el manejo convencional. Sin embargo, al evaluar la comunidad fúngica, 8 de los 21 estudios en suelos, 5 de los 8 en raíz, y 5 de los 11 estudios en la parte aérea de la planta reportaron que la diversidad fúngica no cambia según el tipo de manejo agrícola de forma significativa en ninguna de las tres órganos de la planta (**Figura 1**).

De forma general, el 38.4% de estudios menciona que los sistemas orgánicos promueven mayor diversidad de microorganismos, seguido del 33.9% que reporta que el tipo de manejo no es afecta la diversidad microbiana de forma significativa y 27.7% de estudios que el manejo convencional favorece la diversidad microbiana.

### **Efecto de los diferentes órganos de la planta y regímenes de fertilización sobre la diversidad alfa.**

Para los dos tipos de manejo muestreados, se obtuvo un total de 233,595 lecturas para bacterias y 1,670,504 lecturas para hongos de 12 muestras (2 tipos de manejo, 3 órganos de la planta, 2 réplicas). Luego de normalizar los datos, 28,800 lecturas de bacterias y 300,000 de hongos fueron retenidas para el análisis. Las secuencias de alta calidad generaron 2,190 ASVs para bacterias y 1,118 ASVs para hongos.

Los índices de biodiversidad Chao1, Inverso de Simpson e Evenness fueron mayores en la rizósfera, seguida del suelo y luego la hoja, a excepción de Inv Simpson en la comunidad fúngica el cual fue mayor en suelo (**Tabla 1 y 2**).

Por otro lado, al evaluar el efecto del tipo de manejo agrícola sobre la diversidad alfa de las comunidades microbianas para cada fracción por separado, se observó que los tres índices mostraron una mayor diversidad en el manejo convencional en comparación con el orgánico, siendo esto cierto para la rizósfera y suelo. Al evaluar las hojas, los índices Inv Simpson e Evenness, respaldaron una mayor diversidad bacteriana en el manejo orgánico, mientras que, en el caso de la comunidad fúngica de la hoja, esta fue más diversa en el manejo convencional (**Tablas 1 y 2**).

### **Efecto de los diferentes órganos de la planta y regímenes de fertilización sobre la diversidad beta**

Las comunidades bacterianas se separan en clusters diferentes según la fracción. La coordenada 1, que representa el 29,9% de la variación, separa las fracciones subterráneas (rizósfera y suelo) de la aérea (hoja). El análisis PERMANOVA mostró que la variable fracción tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la composición de la comunidad bacteriana explicando el 43% de la variación. En el caso de la comunidad fúngica, este efecto fue menor pero igualmente significativo ( $p < 0.05$ ) y se observó que los clusters de las distintas

fracciones se encuentran más dispersos. El PERMONOVA corroboró las observaciones mostrando que la variación explicada por la variable fracción fue de 26% (**Figura 2**).

Al maximizar la discriminación entre los diferentes sistemas agrícolas, orgánico y convencional, mediante análisis canónico de coordenadas principales (CAP), se observó para ambos grupos de microorganismos dos clusters según el tipo de manejo separados por la coordenada 1. El PERMANOVA indicó que el tipo de manejo agrícola tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre las comunidades bacterianas y fúngicas, explicando un 11% de la varianza en la población de hongos en comparación con el 9.3% en la comunidad de bacteriana (**Figura 2**).

### **Composición de bacterias y hongos en las diferentes órganos de la planta analizados y manejos agrícolas**

La abundancia relativa de las bacterias fue investigada a nivel de filo, y los más abundantes en todas las muestras fueron Proteobacteria (49,6%), Firmicutes (11%), Bacteroidetes (10,5%), Acidobacteria (7,8%) y Actinobacteria (6,6%). La composición de filos fue similar para el suelo y rizósfera, pero en la hoja hubo una abundancia relativa predominante de Proteobacteria (78,4%) y Firmicutes (19,3%).

Dentro de cada fracción, hubo cambios en la distribución de filos en función de los diferentes tipos de manejo. El manejo orgánico aumentó la abundancia relativa de Proteobacteria en el suelo y rizósfera, pero disminuyó en la hoja en comparación con el convencional. El filo Firmicutes se encontró aumentado en el suelo y la hoja orgánica y en la rizósfera convencional. El manejo orgánico enriqueció a Bacteroidetes en las tres fracciones, mientras que Acidobacteria, Actinobacteria, Patescibacteria y Chloroflexi se encontraron aumentados en el suelo y rizósfera convencional (**Figura 3A**). En la **Figura 3** se observó que el manejo convencional tiene más cantidad de ASVs encontrados únicamente en este manejo en el suelo (723 ASVs), rizósfera (621 ASVs) y hoja (111 ASVs) en comparación con el

orgánico (247, 348 y 58 ASVs respectivamente). La fracción con la mayor cantidad de ASVs compartidos entre ambos manejos fue la hoja (24%) seguido de la rizósfera (9,9%) y finalmente el suelo (2,7%). Finalmente a una escala taxonómica más fina, en la **Figura 5** se observó que el manejo orgánico en el suelo y rizósfera tiende a enriquecer la mayoría de ASVs, mientras que en las hojas el enriquecimiento es similar en ambos manejos.

Por otro lado, la abundancia relativa de los hongos fue revisada a nivel de clase, siendo Sordariomycetes (34,6%), Dothideomycetes (17,4%), Eurotiomycetes (11,9%), Agaricomycetes (8,6%) y Mortierellomycetes (6,5%) las más abundantes independientemente de la fracción o manejo. En este caso la abundancia relativa de las clases varía mucha más entre fracciones y entre manejos agrícolas.

En general, la abundancia de Sordariomycetes se vio favorecida por el manejo convencional en las tres fracciones. Dothideomycetes se encontró ligeramente enriquecido en el suelo y rizósfera bajo manejo orgánico, pero en la hoja la abundancia de esta clase de hongos fue mucho mayor en el manejo orgánico. La hoja y suelo orgánico aumentaron la abundancia de Malasseziomycetes. Finalmente en la rizósfera, hubo un aumento evidente de la clase Agaricomycetes bajo manejo convencional, mientras que Mortierellocytes se vio muy favorecido por un manejo orgánico (**Figura 4A**). En los diagramas de Venn (**Figura 4**) se observó que el manejo convencional tiene más cantidad de ASVs encontrados únicamente en este manejo en el suelo (496 ASVs) y rizósfera (270 ASVs) mientras que la hoja tuvo más ASVs asociados al manejo orgánico (135 ASVs). La fracción con la mayor cantidad de ASVs compartidos entre ambos manejos es la rizósfera (20,6%) seguido de la rizósfera (8,4%) y finalmente el suelo (5,4%). En los mapas de calor de la **Figura 6**, a una escala taxonómica más fina, se observa que el enriquecimiento de ASVs es más equitativo entre ambos manejos en las tres fracciones.

## DISCUSIÓN

### **El efecto del manejo agrícola sobre los microorganismos varía en la literatura**

Las plantas han evolucionado junto con microorganismos cuyo rol en los agroecosistemas ha sido reportado extensamente en la literatura (Dos Santos y Olivares, 2021; Schlaeppli y Bulgarelli, 2015), lo que ha permitido acumular información sobre la dinámica del microbioma vegetal. Sin embargo, aún no se conoce del todo cómo dichas comunidades responden a los diferentes tipos de sistemas agrícolas. Los resultados obtenidos en la revisión sistemática de literatura muestran que el manejo orgánico generalmente tiene efectos positivos sobre la diversidad. Sin embargo este efecto difiere entre varios estudios según la metodologías y variables evaluadas en cada estudio, por ejemplo, el órgano de la planta y estadio de crecimiento (Longley et al, 2020), diferentes años de muestreo (Hartmann et al, 2015; Zhang et al, 2019), ubicaciones geográficas y composición del fertilizante (Zhang et al, 2021; Peruzzi et al, 2017), e incluso diferentes estrategias de secuenciamiento (Aparna et al.,2014). Por estos motivos, los efectos del tipo de manejo agrícola sobre el microbioma asociados a los cultivos son complejos y diversos, y resulta difícil obtener conclusiones universales válidas. Similares resultados se han encontrado en la revisión de literatura realizada por Bengtsson et al. (2005) quienes evalúan la macrobiota de los ecosistemas agrícolas, encontrando que los resultados variarían entre grupos de organismos y paisajes dado que la heterogeneidad del paisaje es un factor que influye en la biodiversidad de las diferentes áreas geográficas.

### **El órgano de la planta y manejo agrícola son factores importantes para la estructuración del microbioma**

Varios de los factores que dan forma a las comunidades de bacterias y hongos incluye el compartimiento de la planta, factores ambientales y genotipo del hospedador (Trivedi et al, 2020). El compartimiento de la planta es probablemente la variable que induce el mayor

efecto sobre la estructura de las comunidades microbianas siendo en muchos casos igual o más fuerte que el tipo de manejo y otras variables (Longley et al, 2020; Miura et al, 2019). En este estudio se encontró que las muestras se agrupan según el compartimento de la planta analizada y, el suelo y rizósfera se asemejan más en comparación con las hojas (**Figura 2A**), esto no es sorprendente si se considera que los microorganismos presentes en la rizósfera se reclutan a partir del suelo (Qu et al, 2020). Otro de los factores importantes al ensamblar las comunidades microbianas es el tipo de manejo agrícola (Singh et al, 2020), en este estudio este efecto fue mayor para las comunidades fúngicas en comparación con las bacterias. El establecimiento de hongos en la rizosfera y en las raíces de las plantas se ve más afectado por las variaciones estocásticas y responde de manera diferente a los factores ambientales que las bacterias (Trivedi et al, 2020).

### **El manejo agrícola convencional favorece a la diversidad microbiana**

A parte de ensamblar una comunidad diferente de bacterias, las hojas tuvieron menos diversidad que los otros compartimentos analizados (**Tabla 1**), lo mismo que reporta Sun et al. (2021) en su estudio en sorgo. Se ha sugerido que existe una disminución de la diversidad del suelo a la rizósfera y luego hacia la parte aérea de la planta como las flores y hojas, indicando la influencia de factores específicos del huésped en las diferentes interfaces (Trivedi et al, 2020).

Al evaluar el efecto del tipo de manejo sobre la diversidad bacteriana y fúngica, se encontró que esta fue mayor en el suelo y rizósfera convencional. En general se tiende a pensar que el tipo de manejo orgánico albergará mayor diversidad microbiana dado que la aplicación de un sustrato rico en nutrientes como el compost generan nichos heterogéneos que pueden ser ocupados con una comunidad microbioma altamente variable, mientras que el estrés inducido por el uso de pesticidas disminuirá la diversidad al inhibir ciertos grupos de microorganismos (Lupatini et al, 2017). Sin embargo, esto no se aplica en todos los casos y

hay varios estudios que demuestran lo contrario. Se ha sugerido que la aplicación intensiva de compost puede llevar a la acumulación de metales pesados lo que inhibirá ciertos microorganismos (Tian et al, 2015; Tian et al, 2015). Asimismo, se tiene la hipótesis que la disponibilidad de un sustrato rico en nutrientes como en el manejo orgánico, promueven la reproducción intensiva de organismos copiotróficos (Hartmann et al, 2015) desplazando a otros, por lo que la diversidad se verá reducida dada la predominancia únicamente de ciertos microorganismos afectando principalmente la uniformidad. En el caso de las hojas, los índices de diversidad arrojaron diferentes resultados, por lo que no se puede concluir sobre el efecto del tipo de manejo sobre la diversidad microbiana en este órgano. Esto en parte se debe a que el microbioma de la hoja está mayormente influido por la química y topología del tejido foliar y el ambiente alrededor, y menos limitado por propiedades del suelo (Sun et al, 2021).

### **El tipo de manejo agrícola tiene un efecto significativo sobre la composición microbiana**

En este estudio, se observó que el filo Proteobacteria y Bacteroidetes están mayormente enriquecidos en el suelo y rizósfera orgánica, mientras que se detectó un aumento de miembros de los filos Acidobacteria y Actinobacteria en el manejo convencional. Estos resultados concuerdan en parte con lo esperado en base al estilo de vida de estos microorganismos, pues se considera que los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria son principalmente copiotróficos (Fierer et al., 2007), es decir, crecen rápido en ambientes ricos en nutrientes como se considera al manejo orgánico (Hartmann et al., 2015). Por otro lado, Acidobacteria es considerado principalmente oligotrófico, es decir crecen lento en ambientes pobres en nutrientes (Fierer et al., 2007) por lo que se espera que se encuentren enriquecidos en el manejo convencional (Hartmann et al, 2015).

Se ha determinado que no todos los miembros de un grupo taxonómico tienen las mismas características ecológicas (Navarrete et al., 2013) y se espera que las respuestas a los diferentes manejos agrícolas ocurran a niveles taxonómicos bajos (Lupatini et al., 2017). En

efecto, en los mapas de calor (**Figura 5 y 6**) se observa que miembros del mismo grupo taxonómico responden diferente a ambos manejos agrícolas como es el caso del grupo Bacillaceae.

La hipótesis general es que la diversidad microbiana de las plantas es crítica para la funcionamiento y sostenibilidad de los ecosistemas, y se considera que una menor diversidad en el manejo orgánico es desafortunado (Tian et al, 2015), sin embargo, una mayor diversidad puede ser importante solo si está ligado a un componente de funcionalidad ecológica (Bonanomi et al, 2016). En este estudio se encontró que el suelo y la raíz bajo manejo orgánico, tienen más ASVs asociados a funciones ecológicas importantes como es el caso de Acidobacteria, taxón reconocido como keystone en el suelo (Banerjee et al., 2016), involucrada en el ciclo de carbono y consideradas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Kalam et al., 2020). Asimismo, el manejo orgánico enriqueció al taxón *Burkholderia* en el suelo y rizósfera el cual tiene especies promotoras de crecimiento vegetal y degradadoras de materia orgánica recalcitrante (Touceda et al., 2015). Otro taxón enriquecido fue Rhizobiales, reconocido por sus especies fijadoras de nitrógeno, lo que cual aumenta el crecimiento de las plantas y pueden resistir a la presencia de metales pesados reduciendo la necesidad de aplicar fertilizantes (Teng et al., 2015). Por otro lado, al analizar las comunidades fúngicas a una escala taxonómica más fina (**Grafico 6**), se observa un enriquecimiento de *Fusarium* en ambos tipos de manejo, género que alberga especies patógenas para varios cultivos incluido el banano (Ma et al., 2013). También se observó la presencia de hongos con funciones ecosistémicas importantes como *Penicillium* involucrado en la solubilización del fosfato (Wakelin et al., 2004), este se encuentra además enriquecido en las hojas orgánicos donde podría estar jugando un rol de defensa induciendo el desarrollo de resistencia adquirida como se ha observado en hojas de algodón y melón (Amaresan et al., 2020).

## CONCLUSIONES

De los 58 estudios analizados, la mayoría (38%) reporta mayor diversidad microbiana bajo manejo orgánico, seguido de un efecto no significativo del tipo de manejo sobre la diversidad (33.9%).

La estructura de la comunidad microbiana se ve influida de forma significativa por el tipo de órgano analizado, es decir, hoja, rizósfera y suelo. En la hoja este efecto fue menor dado que este tejido de la planta se ve más limitado por la genética del huésped. Es por esto que estudios con esta temática deben enfocarse en el suelo y la rizósfera que se ven más influidos por el tipo de manejo dado que están en contacto directo con las diferentes enmiendas orgánicas e inorgánicas. Por otro lado, la estructura microbiana, se ve influida por los diferentes tipos de manejo agrícola pero se deben tomar en cuenta otras variables importantes como tipo de suelo, estadio y variedad de la planta, entre otros.

En las fincas de banano del Oro analizadas, existe mayor diversidad en el sistema de manejo convencional, pero el orgánico enriquece microorganismos conocidos por su importante rol en los ecosistemas y en la supresión de patógenos

## TABLAS

**Tabla 1.** Parámetros de  $\alpha$ -diversidad para la comunidad de bacterias determinados para los dos tipos de manejo dentro de cada órgano de la planta.

Fracción	Tipo de manejo	Chao 1	Inv Simpson	Eveness
Suelo	<b>Convencional</b>	473.07	188.62	0.93
	Orgánico	148.58	22.61	0.81
Rizósfera	<b>Convencional</b>	525.69	166.41	0.92
	Orgánico	267.42	80.98	0.89
Hoja	Convencional	<b>207.41</b>	3.93	0.41
	Orgánico	110.28	<b>4.27</b>	<b>0.43</b>

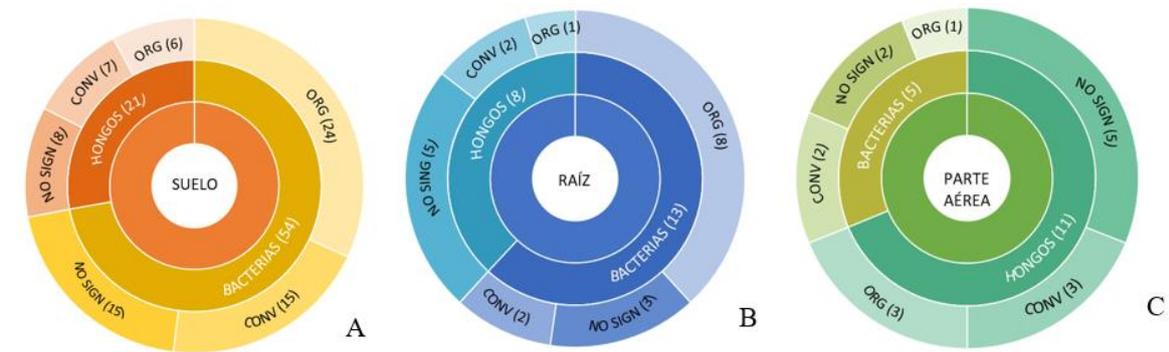
En negrita se encuentra el manejo con los índices más altos de diversidad bacteriana a excepción de la hoja donde los índices difirieron en cada manejo.

**Tabla 2.** Parámetros de  $\alpha$ -diversidad para la comunidad de hongos determinados para los dos tipos de manejo dentro de cada fracción.

Fracción	Tipo de manejo	Chao 1	InvSimpson	Eveness
Suelo	<b>Convencional</b>	352.825	25.255	0.713
	Orgánico	85.500	23.052	0.852
Rizósfera	<b>Convencional</b>	284.712	14.512	0.846
	Orgánico	174.500	22.856	0.863
Hoja	Convencional	34.500	<b>12.430</b>	<b>0.681</b>
	Orgánico	<b>82.500</b>	9.363	0.597

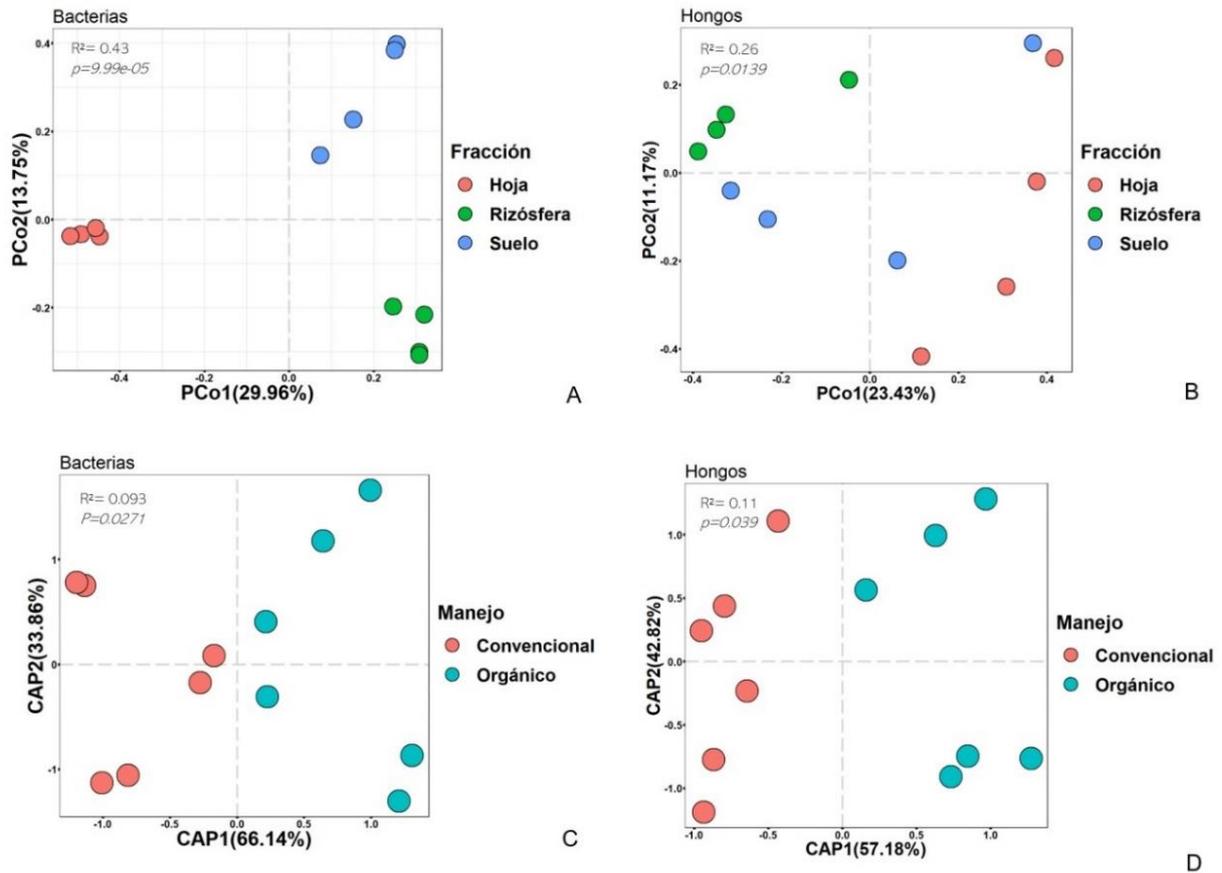
En negrita se encuentra el manejo con los índices más altos de diversidad fúngica a excepción de la hoja donde los índices difirieron en cada manejo.

## FIGURAS



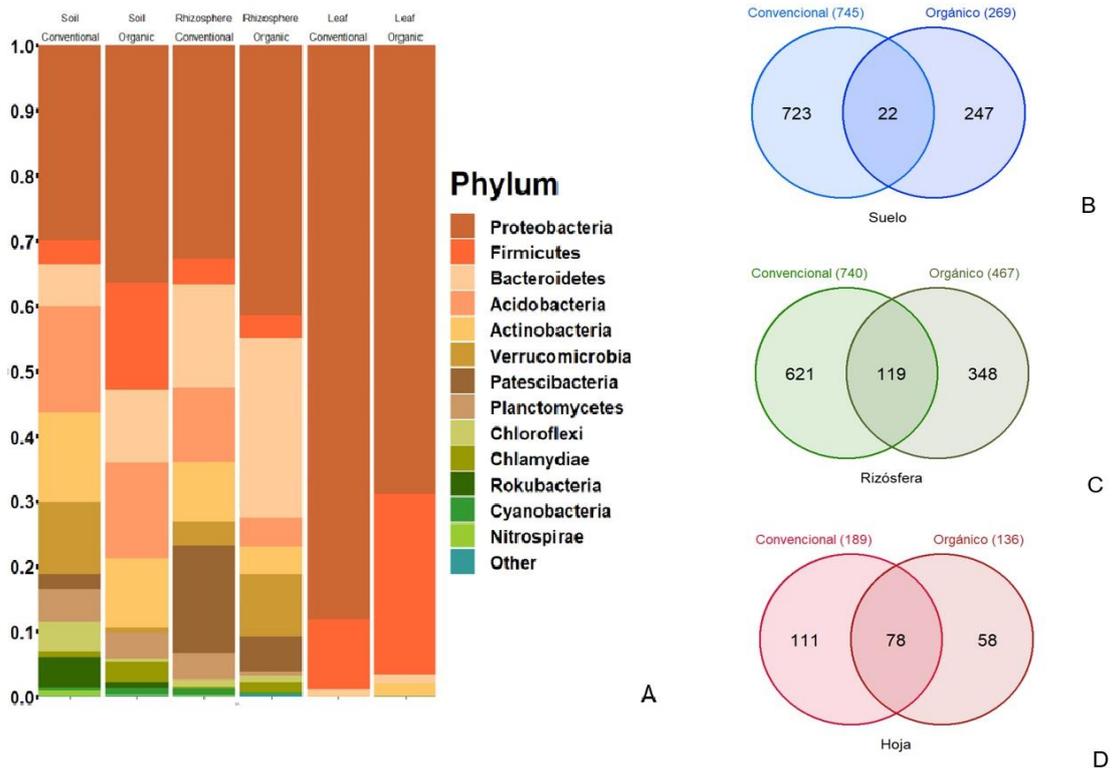
**Figura 1.** Mapas solares del análisis de los estudios incluidos en la revisión sistemática.

Los estudios se analizaron en base a la fracción de la planta analizada, Suelo A), Raíz B) y Parte aérea C). Dentro de cada uno se separaron los estudios por bacterias y hongos. NO SIGN indica que no se ha encontrado un efecto significativo del tipo de manejo sobre la diversidad microbiana, CONV, que el manejo convencional tuvo mayor diversidad y ORG que el manejo orgánico tuvo mayor diversidad. Entre paréntesis se encuentra el número de estudios encontrados para cada caso.



**Figura 2.** Efecto del tipo de órgano de la planta y tipo de manejo en la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas.

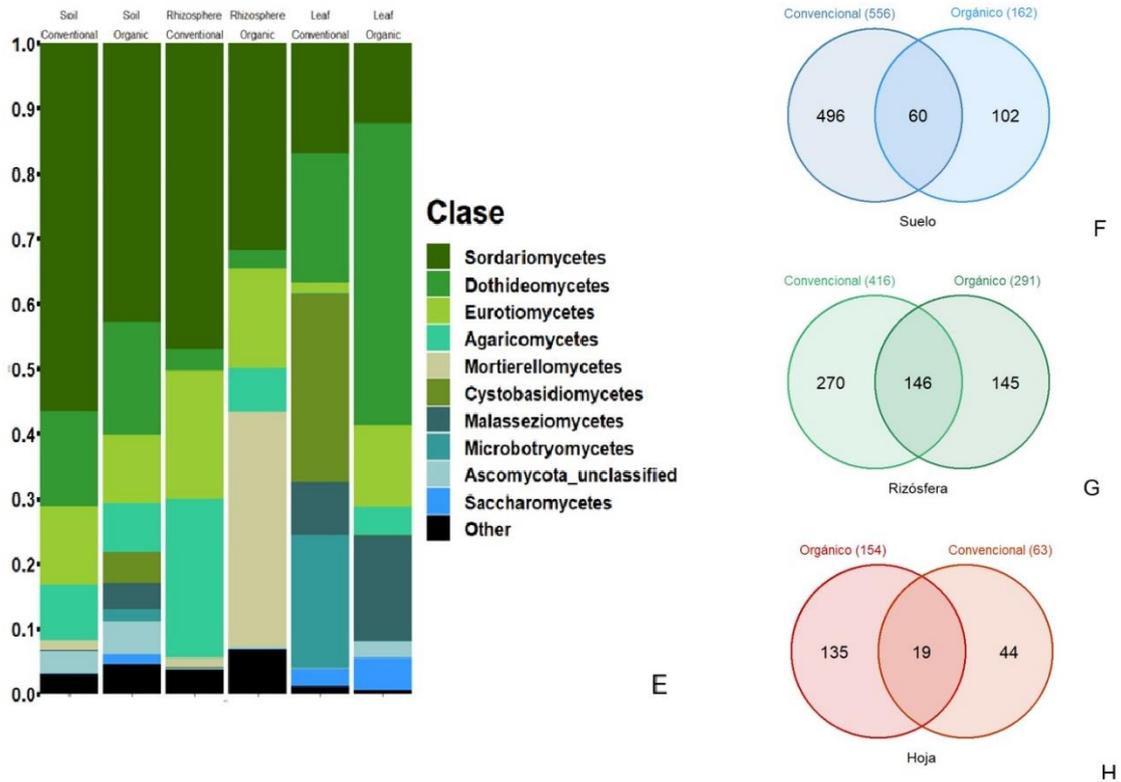
Ordenaciones PCo de similitudes Bray-Curtis calculadas basado en abundancias relativas de ASVs para A) bacterias y B) hongos que muestran diferencias importantes inducidas por la parte de la planta. La varianza explicada por cada eje del PCo está colocada en paréntesis. Ordenaciones CAP de comunidades C) de bacterias y D) de hongos maximizando la discriminación entre los diferentes sistemas agrícolas, orgánico y convencional. La correlación canónica de cada eje CAP, que indica la fuerza de la asociación entre los datos multivariados y la hipótesis de diferencias entre sistemas agrícolas, se da entre paréntesis. La varianza explicada se encuentra en la esquina superior izquierda de los gráficos (con 95% de intervalo de confianza, significancia evaluada con  $10^4$  permutaciones)



**Figura 3.** Cambios en la comunidad bacteriana en las diferentes fracciones de la planta analizadas y asociadas a diferentes tipos de manejo.

Abundancia relativa de A) los filios de bacteria presentes en las diferentes fracciones de las plantas de banano en dos tipos de manejo agrícola diferente, convencional y orgánico.

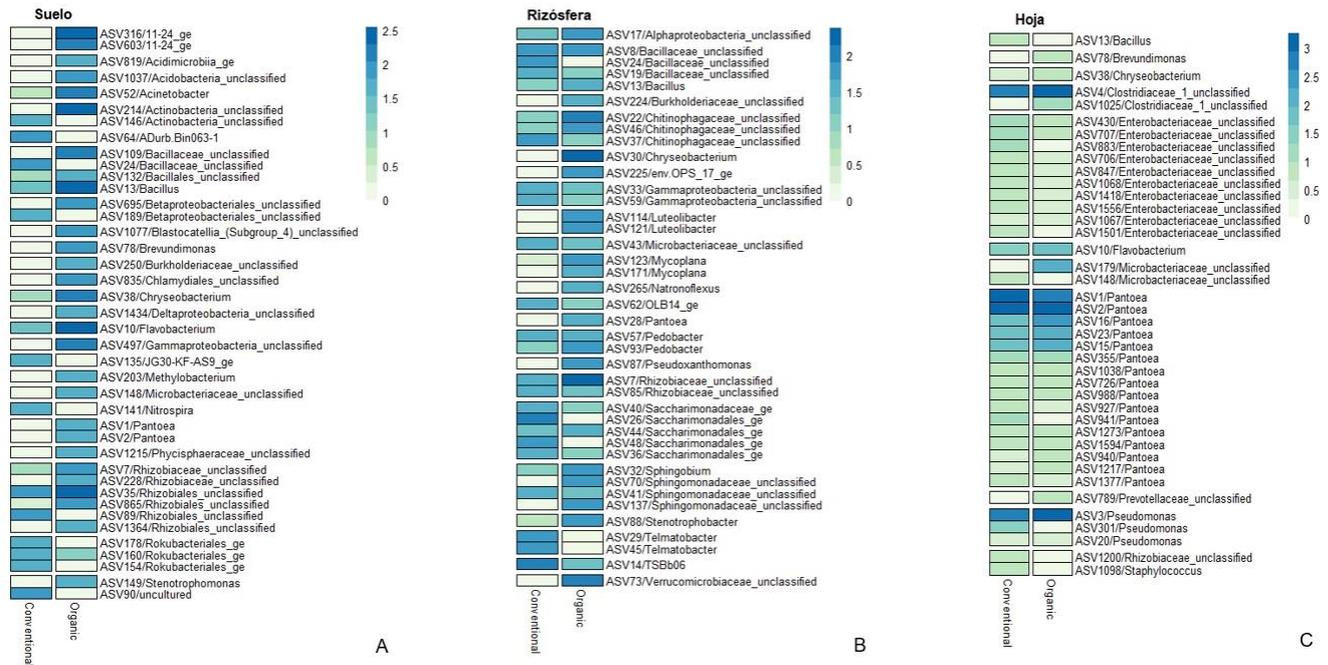
Diagrama de Venn de los tipos de manejo, orgánico y convencional, asociados a B) el suelo C) la rizósfera y D) la hoja. Los ASVs observados para cada tipo de manejo dentro de tres fracciones se produjeron en el algoritmo UCLUST para mostrar las ASVs compartidas y únicas para las comunidades de bacterias.



**Figura 4.** Cambios en la comunidad fúngica en las diferentes fracciones de la planta analizadas asociados a diferentes tipos de manejo.

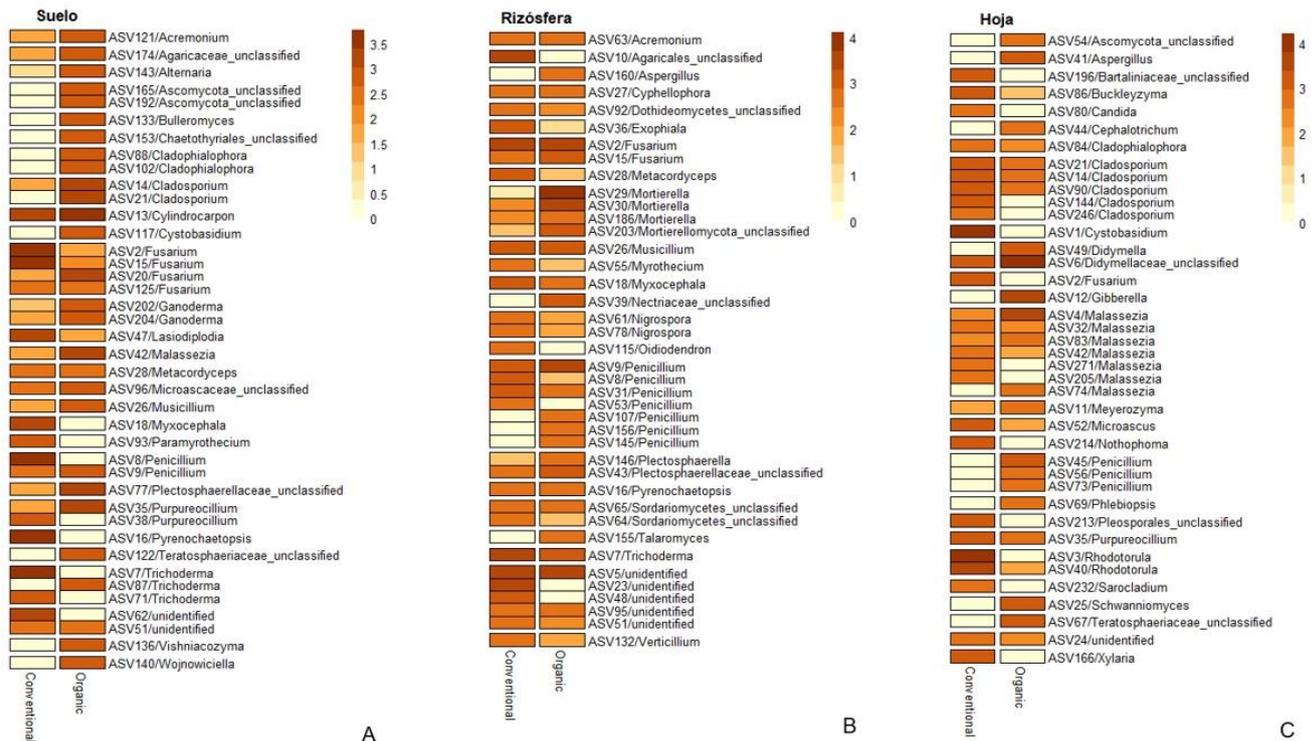
Abundancia relativa de A) las clases de hongos presentes en las diferentes fracciones de las plantas de banano en dos tipos de manejo agrícola diferente, convencional y orgánico.

Diagrama de Venn de los tipos de manejo, orgánico y convencional, asociados a B) el suelo C) la rizósfera y D) la hoja . Los ASVs observados para cada tipo de manejo dentro de tres fracciones se produjeron en el algoritmo UCLUST para mostrar las ASVs compartidas y únicas para las comunidades de hongos.



**Figura 5.** Heatmap de la presencia de microorganismos (ASVs) bacterianos en los diferentes órganos de la planta.

Se muestra la asignación de taxonomía para cada ASV de los diferentes tipos de manejo asociados a A) el suelo, B) la rizósfera y C) las hojas. El heatmap muestra recuentos de los 40 ASVs más abundantes por muestra para la comunidad de bacterias, donde los recuentos están coloreadas según la contribución de cada ASV al recuento total de ASVs presentes en la muestra (azul: aporta un alto porcentaje de AVS a la muestra; verde claro: contribuye con un bajo porcentaje de ASVs).



**Figura 6.** Heatmap de la presencia de microorganismos (ASVs) fúngicas en los diferentes órganos de la planta.

Se muestra la asignación de taxonomía para cada ASV de los diferentes tipos de manejo asociados a A) el suelo, B) la rizósfera y C) las hojas. El heatmap muestra recuentos de los 40 ASVs más abundantes por muestra para la comunidad de hongos, donde los recuentos están coloreadas según la contribución de cada ASV al recuento total de ASVs presentes en la muestra (café: aporta un alto porcentaje de AVS a la muestra; amarillo: contribuye con un bajo porcentaje de ASVs).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrocalidad. (2020). *Oportunidades y desafíos para el mercado internacional para el banano orgánico*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.agrocalidad.gob.ec/oportunidades-y-desafios-del-mercado-internacional-para-el-banano-organico/>
- Amaresan, N., Kumar, M., Annapurna, K., Kumar, K. y Sankaranarayanan, A. (Eds.). (2020). *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Academic Press.
- Aparna, K., Pasha, M., Rao, D. y Krishnaraj, P. (2014). Organic amendments as ecosystem engineers: microbial, biochemical and genomic evidence of soil health improvement in a tropical arid zone field site. *Ecological engineering*, 71, 268-277.
- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S., Anderson, J., Soudzilovskaia, N., Bodegom, P., y Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233-237.
- Bakker, M., Looft, T., Alt, D., Delate, K. y Cambardella, C. (2018). Bulk soil bacterial community structure and function respond to long-term organic and conventional agricultural management. *Canadian journal of microbiology*, 64(12), 901-914.
- Banerjee, S., Kirkby, C., Schmutter, D., Bissett, A., Kirkegaard, J. y Richardson, A. (2016). Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biol. Biochem.* 97, 188–198. doi: 10.1016/j. soilbio.2016.03.017
- Bardgett, R. y Van Der Putten, W. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528), 505-511.
- Bengtsson, J., Ahnström, J. y Weibull, A. (2005). The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. *Journal of applied ecology*, 42(2), 261-269.
- Bonanomi, G., De Filippis, F., Cesarano, G., La Stora, A., Ercolini, D. y Scala, F. (2016). Organic farming induces changes in soil microbiota that affect agro-ecosystem functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 327-336.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., y Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643.
- 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.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., y Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in microbiology*, 8, 1829.
- Chen, H. (2018). Package “VennDiagram” (Versión 1.6.20). <https://cran.r-project.org/>

- Clooney, A. G., Fouhy, F., Sleator, R. D., O'Driscoll, A., Stanton, C., Cotter, P. D., y Claesson, M. J. (2016). Comparing apples and oranges?: next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS one*, *11*(2), e0148028.
- Dos Santos, L. y Olivares, F. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology*, 100198.
- Evenson, R. y Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *science*, *300*(5620), 758-762.
- FAO. (2017). *El futuro de la alimentación y agricultura: tendencias y desafíos*. <http://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- FAOSTAT. (s.f). *Estadísticas de la producción de cultivos*. <http://fenix.fao.org/faostat/internal/es/#data/QC>
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, *88*(6), 1354-1364.
- 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>
- Gamboa, M., Laureano, S. y Bayman, P. (2003). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter?. *Mycopathologia*, *156*(1), 41-45.
- Guillemot, J. (2020). *How to conduct systematic literature reviews: a methodological crash course*. Conferencia llevada a cabo en Instituto de Investigación en Salud y Nutrición de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Gruber, N. y Galloway, J. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, *451*(7176), 293-296.
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P. y Widmer, F. (2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME journal*, *9*(5), 1177-1194.
- Jahan, N., Naveed, S., Zeshan, M. y Tahir, M. (2016). How to conduct a systematic review: a narrative literature review. *Cureus*, *8*(11).
- 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. y Sickel, F. (2011). *No Title*. A Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files (Version 1.33). <https://github.com/najoshi/sickle>
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R., El Enshasy, H., Dailin, D. y Suriani, N. (2020). Recent understanding of soil Acidobacteria and their ecological significance: A critical review. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2712.
- Khush, G. (1999). Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome*, *42*(4), 646-655.

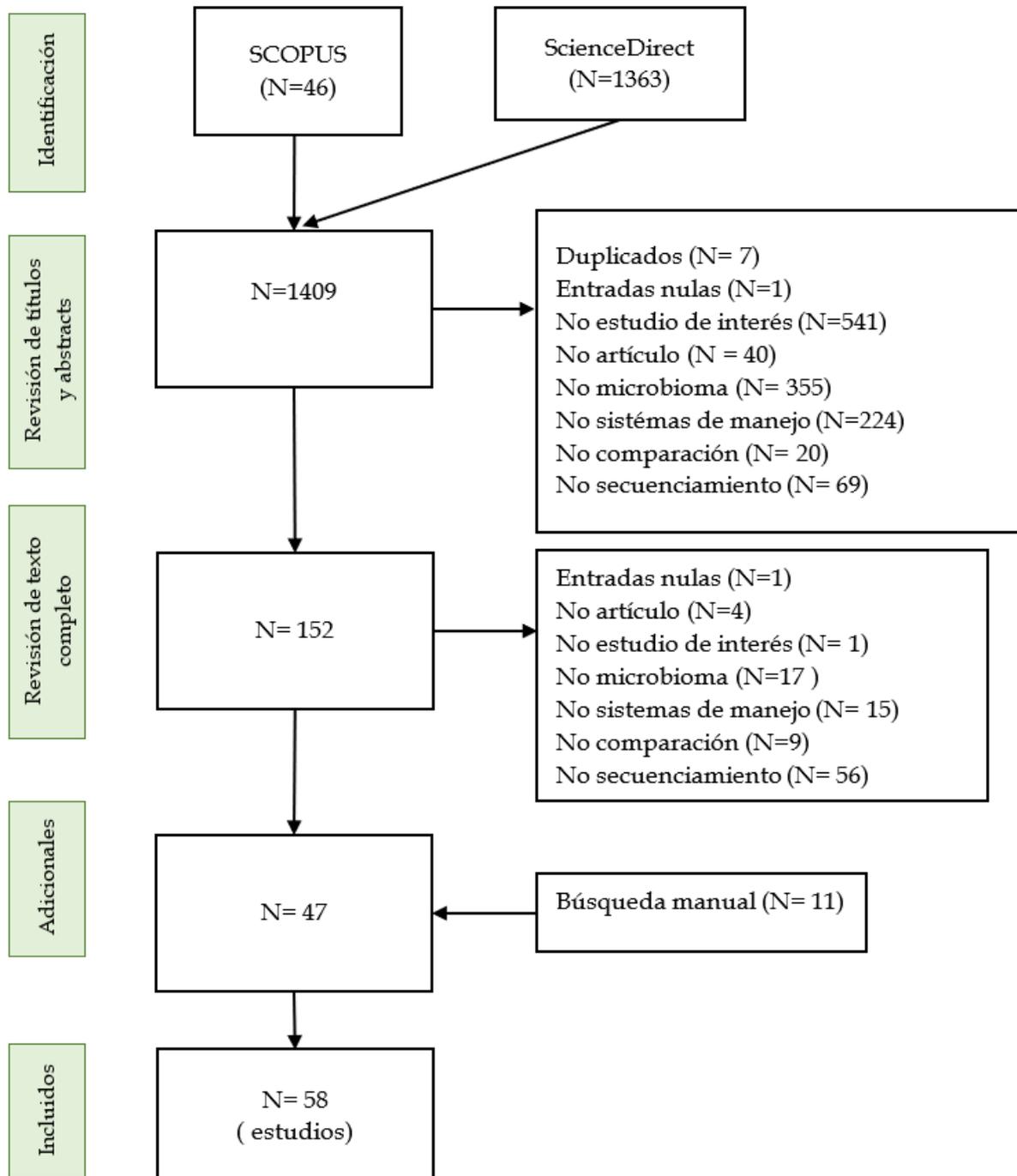
- Kolde, R. (2019). *heatmap: Pretty Heatmaps* (Version 1.0.12). <https://cran.r-project.org/>
- Longley, R., Noel, Z., Benucci, G., Chilvers, M., Trail, F. y Bonito, G. (2020). Crop Management Impacts the Soybean (*Glycine max*) Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1116.
- Lu-Irving, P., Harenčár, 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>
- Lupatini, M., Korthals, G., de Hollander, M., Janssens, T., y Kuramae, E. (2017). Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2064.
- Ma, L., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F. y Kazan, K. (2013). Fusarium pathogenomics. *Annual review of microbiology*, *67*, 399-416.
- Marin, D., Romero, R., Guzmán, M y Sutton, T. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*, *87*(3), 208-222.
- Márquez, J. (2020). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2019*. (Boletín técnico 01-2019-ESPAC). INEC. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec>
- Miura, T., Sánchez, R., Castañeda, L., Godoy, K. y Barbosa, O. (2019). Shared and unique features of bacterial communities in native forest and vineyard phyllosphere. *Ecology and evolution*, *9*(6), 3295-3305.
- Navarrete, A. A., Kuramae, E. E., de Hollander, M., Pijl, A. S., van Veen, J. A., & Tsai, S. M. (2013). Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest
- Oksanen, J., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'hara, R. y Wagner, H. (2016). *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version. 2.0-10. CRAN. <https://cran.r-project.org/soils>. *FEMS microbiology ecology*, *83*(3), 607-621.
- Paul, J., Choudhary, A., Suri, V., Sharma, A., Kumar, V. y Shobhna. (2014). Bioresource nutrient recycling and its relationship with biofertility indicators of soil health and nutrient dynamics in rice–wheat cropping system. *Communications in soil science and plant analysis*, *45*(7), 912-924.
- Pershina, E., Valkonen, J., Kurki, P., Ivanova, E., Chirak, E., Korvigo, I. y Andronov, E. (2015). Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. *PLoS One*, *10*(12), e0145072.
- Peruzzi, E., Franke-Whittle, I. H., Kelderer, M., Ciavatta, C. y Insam, H. (2017). Microbial indication of soil health in apple orchards affected by replant disease. *Applied Soil Ecology*, *119*, 115-127.
- Qu, Q., Zhang, Z., Peijnenburg, W., Liu, W., Lu, T., Hu, B. y Qian, H. (2020). Rhizosphere microbiome assembly and its impact on plant growth. *Journal of agricultural and food chemistry*, *68*(18), 5024-5038.

- Salas, I. (2019). isaisg/ochibi. Github. <https://github.com/isaisg/ohchibi>
- Schlaeppli, K. y Bulgarelli, D. (2015). The plant microbiome at work. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 212-217.
- Schmidt, J. E., Rodrigues, J., Brisson, V., Kent, A. y Gaudin, A. (2020). Impacts of directed evolution and soil management legacy on the maize rhizobiome. *Soil Biology and Biochemistry*, 145, 107794.
- Singh, U., Choudhary, A. y Sharma, S. (2020). Comparative performance of conservation agriculture vis-a-vis organic and conventional farming, in enhancing plant attributes and rhizospheric bacterial diversity in *Cajanus cajan*: A field study. *European Journal of Soil Biology*, 99, 103197.
- Sun, A., Jiao, X., Chen, Q., Wu, A., Zheng, Y., Lin, Y. y Hu, H. (2021). Microbial communities in crop phyllosphere and root endosphere are more resistant than soil microbiota to fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 153, 108113.
- Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., y Luo, Y. (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Frontiers in plant science*, 6, 32.
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agric. Res. J*, 54(1), 1-10.
- Tian, W., Wang, L., Li, Y., Zhuang, K., Li, G., Zhang, J. y Xi, Y. (2015). Responses of microbial activity, abundance, and community in wheat soil after three years of heavy fertilization with manure-based compost and inorganic nitrogen. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 213, 219-227.
- Tian, W., Zhang, Z., Hu, X., Tian, R., Zhang, J., Xiao, X., & Xi, Y. (2015). Short-term changes in total heavy metal concentration and bacterial community composition after replicated and heavy application of pig manure-based compost in an organic vegetable production system. *Biology and Fertility of Soils*, 51(5), 593-603.
- Trivedi, P., Leach, J, Tringe, S., Sa, T. y Singh, B. (2020). Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607-621.
- Touceda, M., Brader, G., Antonielli, L., Ravindran, V. B., Waldner, G., Friesl-Hanl, W. y Sessitsch, A. (2015). Combined amendment of immobilizers and the plant growth-promoting strain *Burkholderia phytofirmans* PsJN favours plant growth and reduces heavy metal uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 140-150.
- Wakelin, S., Warren, R., Harvey, P. y Ryder, M. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 36-43.
- Yin, C., Fan, F., Song, A., Li, Z., Yu, W. y Liang, Y. (2014). Different denitrification potential of aquatic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of nirS- and nirK-denitrifying bacterial community. *European journal of soil biology*, 65, 47-56.

- Zhang, J., Bei, S., Li, B., Zhang, J., Christie, P. y Li, X. (2019). Organic fertilizer, but not heavy liming, enhances banana biomass, increases soil organic carbon and modifies soil microbiota. *Applied Soil Ecology*, 136, 67-79.
- Zhang, M., Zhang, X., Zhang, L., Zeng, L., Liu, Y., Wang, X.y Ai, C. (2021). The stronger impact of inorganic nitrogen fertilization on soil bacterial community than organic fertilization in short-term condition. *Geoderma*, 382, 114752.

## ANEXOS

**ANEXO 1. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA EL SCREENING LOS ESTUDIOS ENCONTRADOS PARA LA REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA**



## ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA RECUPERACIÓN DE ENDÓFITOS DE LA HOJA

Paso	Detalle del protocolo
Desinfección de la superficie foliar (Lu-Irving et al., 2019; Gamboa, Laureano y Bayman, 2003)	Sumergir pequeños pedazos de tejido en una solución de NaClO 10% y Tween 0.1% por dos minutos, y se lavó los pedazos en ddH <sub>2</sub> O durante dos minutos
Conservación de muestras	Nitrógeno líquido y liofilización
Digestión enzimática (Jiao et al., 2006).	Colocar la solución enzimática (Macerozima 0.1%, Celulasa 1%, D-Manitol 0.7M, MES 5mM, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 9μM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 65μM, pH 5.7) y las hojas en una relación 5:1
Incubación (Jiao et al., 2006).	En un shaker a 28°C, 125 rpm, por 48 horas.
Centrifugación seriada (Jiao et al., 2006)	Tres centrifugaciones seriadas a 500 rcf por 5 min, rescatando el sobrenadante, y otra a 3000 rcf por 20 min. El pellet obtenido, se resuspende con PBS y una vez colocado en tubos Eppendorf 1.5 ml, se centrifuga una última vez a 13000 rpm por 1 min, se descarta el sobrenadante y se conserva a -20°C

**ANEXO 3. DETALLE DE LA CONCENTRACION DE LOS REACTIVOS USADOS  
PARA LA PCR PREVIO A LA SECUENCIACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS**

Reactivos – Bacterias			Reactivos - Hongos		
Kapa Biosystems, Wilmington, MA  (Finkel et al., 2019)	Kapa Enhancers	5 $\mu$ l	Bioron, Ludwigshafen, Alemania  (Finkel et al., 2019)	MgCl <sub>2</sub>	2mM
	Kapa Buffer	5 $\mu$ l		Buffer	1 U
	Cada primer	1.25 $\mu$ l de 5 $\mu$ M		Cada primer	300 nM
	Ácidos nucleicos peptídicos bloqueadores de genes ARNr	0.375 $\mu$ l		Albúmina de suero bovina	0.3%
	Kapa dNTPs	0.5 $\mu$ l		dNTPS	200 $\mu$ M
	Kapa Robust Taq	0.2 $\mu$ l		DFS-Taq DNA	2 U
	dH <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l	DNA	10 ng	
	DNA	5 $\mu$ l			

**ANEXO 4. DETALLE DE LOS CICLOS DE LA PCR PREVIA AL  
SECUENCIAMIENTO PARA BACTERIAS Y HONGOS**

Ciclos para bacterias	Temperatura y tiempo	Ciclos para hongos	Temperatura y tiempo
	95°C x 60 segundos		94°C x 2 minutos
24 ciclos	95°C x 15 segundos	25 ciclos	94°C x 30 segundos
	78°C x 10 segundos		55°C x 30 segundos
	50°C x 30 segundos		72°C x 30 segundos
	72°C x 30 segundos		72°C x 10 minutos
Conservación	4°C	Conservación	4°C