



**“Determinación de perfiles taxonómicos de la microbiota del suelo y de tejido vegetal de
banano Gros Michel en localidades afectadas por Fusariosis”**

Paredes Salgado, Estefany Margarita

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

26 de agosto del 2021

Resultados de análisis de Urkund



Document Information

Analyzed document	EParedesUrkund.txt (D111761679)
Submitted	8/27/2021 8:22:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	ilbbioteca.GDC@analysis.urkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://docplayer.es/189649571-Fusarium-raza-4-tropical-r4t.html Fetched: 11/26/2020 7:13:41 PM	 1
W	URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.595845/full Fetched: 8/27/2021 8:22:00 PM	 1
W	URL: https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/PlandecontingenciacontraFocR4TOIRSA.pdf Fetched: 5/4/2020 2:31:35 AM	 2
SA	monografia SALAZAR CHRISTIAN.docx Document monografia SALAZAR CHRISTIAN.docx (D75090767)	 4
W	URL: https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/18360/1/%C3%81lvarezValentina_2020_Capacitaci%C3%B3nFusarium%20oxysporumyTrichoderma.pdf Fetched: 7/1/2021 8:03:06 PM	 1
W	URL: https://www.redalyc.org/jatsRepo/437/43761812020/html/index.html Fetched: 12/19/2020 9:27:57 AM	 1



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Determinación de perfiles taxonómicos de la microbiota del suelo y de tejido vegetal de banano Gros Michel en localidades afectadas por Fusariosis**” fue realizado por la señorita **Paredes Salgado, Estefany Margarita** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de agosto de 2021



Firmado electrónicamente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Paredes Salgado, Estefany Margarita**, con cédula de ciudadanía n°1750146373, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Determinación de perfiles taxonómicos de la microbiota del suelo y de tejido vegetal de banano Gros Michel en localidades afectadas por Fusariosis** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 26 de agosto de 2021

Paredes Salgado, Estefany Margarita

C.C.: 1750146373



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Paredes Salgado, Estefany Margarita**, con cédula de ciudadanía n°1750146373, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Determinación de perfiles taxonómicos de la microbiota del suelo y de tejido vegetal de banano Gros Michel en localidades afectadas por Fusariosis** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 26 de agosto de 2021



Paredes Salgado, Estefany Margarita

C.C.: 1750146373

Dedicatoria

¡A Dios la gloria!

"Grandes son las obras del Señor, estudiadas por las que en ellas se deleitan"

Salmo 111:2 NVI

A mis padres Alberto y Margarita

A mi hermano Josué

Los amo con todo mi corazón.

Estefany Margarita Paredes Salgado

Agradecimientos

Deseo empezar agradeciendo a Dios. El creador del cielo y las estrellas, porque en su gracia inmerecida me escogió antes de nacer y me dio vida, una familia, sueños y la fortaleza cumplirlos. Gracias por su infinito amor.

Quiero agradecer a la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia –CEDIA por el financiamiento del proyecto CEPRA XIV-2020-06 “Iniciativa FUSARIUM, una plataforma multipropósito para la prevención y manejo de la Fusariosis raza 4 tropical en Ecuador - FASE I: Efectividad de productos desinfectantes y análisis de microbiomas asociados a banano”, asimismo gratifico a CEDIA por el acceso al *cluster* de alto rendimiento (HPC CEDIA) donde se realizaron parte de los análisis bioinformáticos del presente trabajo de titulación.

De igual manera me gustaría agradecer a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a los directivos de la carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Al Dr. Francisco Flores por ser un remarcable docente y guía durante mi carrera universitaria y a lo largo de la elaboración de la presente investigación. Por todo su tiempo, confianza y por ser un pilar sustancial en mi formación tanto personal como profesional. Además, le agradezco por abrir las puertas del Laboratorio de diagnóstico molecular IDgen, lugar donde realicé la parte experimental de mi trabajo de titulación.

Al Dr. Freddy Magdama, director de la Iniciativa FUSARIUM, por su seguimiento constante y su esencial labor en el muestreo realizado para la presente investigación.

A Fiana Guevara M.Sc., por su guía y ayuda fundamental en la elaboración de mi trabajo de titulación. Gracias por responder mis numerosas preguntas.

A mis docentes Alma Koch, Mónica Jadan, Claudia Segovia y Freddy Proaño por su apoyo a lo largo de mi carrera universitaria. Estoy agradecida por invertir

abnegadamente su tiempo y conocimientos en mí. Son un ejemplo a seguir para todos sus estudiantes, los cuales siempre los recordaremos con gran aprecio.

A mis padres Alberto y Margarita, por ser los promotores de mis sueños, porque su amor incondicional y oraciones han sido un pilar en mi vida. Gracias por la paciencia, los consejos y los valores inculcados pero sobre todo gracias por confiar y creer en mí. Gracias por ser mis amigos y amarme como soy.

A mi hermano Josué, gracias por brindarme tu apoyo. Eres un regalo valioso que Dios me dio y espero nunca dar por hecho el que sepas cuanto te amo.

A mis queridas abuelitas Luisita e Isabelita, gracias por todo su cariño, apoyo y amorosos consejos llenos de sabiduría. Gracias por ser un refugio para mí.

A mis tíos Sandra, Geovanny, Yolanda, Andrés, Sofía, Orlando, Susana y Edwin gracias por constantemente estar disponibles para mí con sus palabras de aliento.

A mis primos Moisés, Mateo, Gabriela, David, Gabriel, Belén, Santiago, Víctor, Wendy, Sara y Bryan, gracias por siempre animarme a continuar. Son una bendición en mi vida. A Jonathan porque ingresé a esta universidad siguiendo sus pasos.

A Shani, porque puedo pensar en voz alta estando junto a ti. Gracias por ser como una hermana para mí y por todas las aventuras que hemos compartido juntas.

A mis amigos y compañeros de este emocionante viaje Camila, Michelle, Carolina, Víctor, Olga, Alexis, Cesar, Paul, Nathaly, José y Dimitri gracias por motivarme a continuar con mi carrera, por cada momento que compartimos y por cada consejo. Deseo que sepan que los quiero mucho y que aunque ya no compartiremos tanto tiempo juntos siempre pueden contar conmigo incondicionalmente. Gracias a todas aquellas personas que han contribuido a que sea un mejor ser humano.

Al grupo de Biología sintética iGEM Ecuador, porque al ser parte del mismo he aprendido el valor del liderazgo, el esfuerzo *ad honorem*, la constancia y la amistad.

Índice de contenido

Resultados de análisis de Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	4
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Listado de tablas.....	13
Listado de figuras.....	14
Listado de abreviaturas	16
Resumen.....	18
Abstract	19
Capítulo I: Introducción.....	20
Formulación del problema	20
Justificación del problema	22
Objetivos	24
Objetivo General.....	24
Objetivos Específicos	24
Capítulo II: Marco teórico.....	25
Banano.....	25
Importancia agrícola	25

Producción bananera en Ecuador.....	27
Fusariosis del banano.....	27
Antecedentes.....	27
Fusariosis del banano en Ecuador.....	30
Agente causal.....	30
Etiología.....	32
Sintomatología.....	33
Compatibilidad vegetativa	34
Manejo	34
Agentes biológicos.....	35
Microbioma.....	36
Generalidades	36
Microbioma endofítico	37
Metagenómica y Metataxonómica	40
Extracción de ADN	41
Secuenciación de alto rendimiento	42
Secuenciación por amplicones	44
Análisis bioinformático.....	45
Pipeline	47
Análisis exploratorio de datos del microbioma.....	49
Ecología microbiana	49

Inferencia estadística del microbioma.....	50
Abundancia diferencial	51
Hipótesis	51
Capítulo III: Materiales y Métodos	52
Muestreo	53
Nomenclatura de muestras	55
Extracción de ADN.....	56
Evaluación de la calidad del ADN.....	56
Electroforesis de ADN	56
Espectrofotometría NanoDrop™ 2000c	57
Secuenciación masiva paralela	57
Pipeline bioinformático.....	58
Pre tratamiento de secuencias.....	60
Inferencia de ASVs.....	60
Análisis exploratorio del microbioma.....	61
Análisis de ecología microbiana.....	62
Análisis estadístico	62
Capítulo IV: Resultados	63
Lecturas de secuenciación por amplicones.....	63
Análisis exploratorio bacteriano.....	65
Análisis exploratorio fúngico.....	77

Análisis de ecología microbiana	87
Diversidad <i>Alpha</i>	87
Diversidad <i>Beta</i>	90
Análisis estadístico	92
Capítulo V: Discusión	93
Capítulo VI: Conclusiones	105
Capítulo VII: Recomendaciones	107
Bibliografía	109
Anexos	128

Listado de tablas

Tabla 1. Clasificación de Foc en razas en función de principales subgrupos de banana	32
Tabla 2. Coordenadas de la ubicación del muestreo	53
Tabla 3. Nomenclatura descriptiva en base a dígitos.....	55
Tabla 4. Primers usados en la preparación de librerías para secuenciación por amplicones en Illumina Miseq	58
Tabla 5. Resumen del procesamiento de lecturas posterior a la inferencia de ASVs en R DADA2	65
Tabla 6. ASVs bacterianos con abundancia diferencial en muestras asintomáticas	75
Tabla 7. ASVs fúngicos con abundancia diferencial en muestras sintomáticas.....	87
Tabla 8. PERMANOVA basado en distancia UniFrac ponderado para diferencias en la composición de la comunidad en base a sintomatología	92

Listado de figuras

Figura 1. Morfología de planta del banano, se aprecia el tallo verdadero (representación en turquesa) en el interior del pseudotallo.	26
Figura 2. Distribución mundial de la marchitez del banano por <i>Fusarium</i>	29
Figura 3. Esquema de la composición del término microbioma	37
Figura 4. Flujo de trabajo del presente proyecto de titulación	52
Figura 5. Ubicación geográfica del área de muestreo	53
Figura 6. Esquema del muestreo realizado.....	54
Figura 7. Descripción del pipeline empleado en el presente trabajo de titulación	59
Figura 8. Perfiles de calidad de secuencias representativas para (A) Bacterias y (B) Hongos.....	64
Figura 9. Asignación taxonómica bacteriana (filo) en función de abundancia relativa y agrupación en base a sintomatología.....	66
Figura 10. Asignación de taxonómica bacteriana (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a sintomatología	68
Figura 11. Mapas de calor de géneros bacterianos. (I) General en función de tejidos, (II) Pseudotallo, (III) Rizoma y (IV) Rizosfera	69
Figura 12. Árbol de calor bacteriano: Pseudotallo	71
Figura 13. Árbol de calor bacteriano: Rizoma.....	72
Figura 14. Árbol de calor bacteriano: Rizosfera.....	73
Figura 15. ASVs bacterianos con abundancia diferencial máxima en (I) Pseudotallo, (II) Rizoma y (III) Rizosfera	74
Figura 16. Asignación taxonómica fúngica (filo) en función de abundancia relativa y agrupación en base a tejido.....	77

Figura 17. Asignación taxonómica fúngica (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a tejido.....	78
Figura 18. Asignación taxonómica fúngica (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a tejido sin <i>outliers</i>	79
Figura 19. Asignación de taxonómica fúngica (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a sintomatología	80
Figura 20. Mapas de calor de géneros fúngico abundantes en (I) Pseudotallo, (II) Rizoma y (III) Rizosfera	81
Figura 21. Árbol de calor fúngico: Pseudotallo.....	82
Figura 22. Árbol de calor fúngico: Rizoma	83
Figura 23. Árbol de calor fúngico: Rizosfera	84
Figura 24. ASV fúngico con abundancia diferencial máxima en muestras asintomáticas de rizosfera.....	85
Figura 25. ASVs fúngicos con abundancia diferencial máxima en muestras sintomáticas (I) Pseudotallo y (II) Rizosfera	86
Figura 26. Curvas de rarefacción para (I) 16S V3-V4 e (II) ITS2 en función de tejido... 88	
Figura 27. Diversidad <i>Alpha</i> observada en la comunidad (A) bacteriana y (B) fúngica. 89	
Figura 28. Diversidad <i>Beta</i> bacteriana: PCoA. (A) Bray-Curtis: Tejido, (B) Bray-Curtis: Sintomatología, (C) UniFrac: Tejido y (D) UniFrac: Sintomatología	90
Figura 29. Diversidad <i>Beta</i> fúngica: PCoA. (A) Bray-Curtis: Tejido, (B) Bray-Curtis: Sintomatología, (C) UniFrac: Tejido y (D) UniFrac: Sintomatología.....	91

Listado de abreviaturas

ITS: Internal Transcribed Spacer

ARN: Ácido Ribonucleico

ASV: Amplicon Sequence Variant

PERMANOVA: Permutational Multivariate Analysis of Variance

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FWB: Fusarium Wilt of Banana

GCV: Grupo de Compatibilidad Vegetativa

MIDAGRI: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Perú

SIPA: Sistema de Información Pública Agropecuaria

AEBE: Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador

OIRSA: Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

COE: Comité de Operaciones Especiales Nacional

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

CB: Control Biológico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

HTS: High Throughput Sequencing

PCR: Polymerase Chain Reaction

ADNr: Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal

ITS: Internal Transcribed Spacers

OTU: Operational Taxonomic Units

QC: Quality Control

DADA: Divisive Amplicon Denoising Algorithm

PCoA: Principal Coordinates Analysis

NMDS: Non-metric Multidimensional Scaling

UTM: Universal Transverse Mercator

HPC: High Performance Computing

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

pb: Pares de Bases

CG: Citosinas y Guaninas

CG: Citosinas y Guaninas

16S: Subunidad 16

Resumen

La producción de banano del Ecuador está en riesgo debido a la presencia cercana del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (Foc R4T), causante de la Fusariosis del banano, enfermedad que devasta a gran variedad de cultivares de banano y plátano. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar taxonómicamente la microbiota de plantas de banano Gros Michel sintomáticas y asintomáticas para Fusariosis, con el fin de identificar grupos de microorganismos potencialmente supresivos contra Foc R4T. Se obtuvieron lecturas de secuenciación de alto rendimiento por amplicones de tres entornos (pseudotallo, rizoma y suelo de la rizosfera), se consideró la subunidad 16S para bacterias y el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) para hongos. En plantas asintomáticas, los géneros *Pectobacterium*, *Klebsiella*, y *Candidatus Udaeobacter* dominaron la microbiota bacteriana del pseudotallo, rizoma, y rizosfera, respectivamente. El análisis metataxonómico reveló que los miembros de las clases *Gammaproteobacteria* y *Bacilli* se presentaron en mayor abundancia relativa y abundancia diferencial en muestras de tejido vegetal asintomático. En relación a la comunidad fúngica, *Ascochyta* y *Antrodia* fueron los principales géneros presentes en todos los entornos independientemente de la sintomatología. *Fusarium oxysporum* y *Rhodotorula mucilaginosa* presentaron abundancia diferencial en muestras sintomáticas y miembros de la familia *Ceratobasidiaceae* en muestras asintomáticas. Este es el primer estudio en Ecuador que presenta una visión integral de la microbiota de bananos Gros Michel afectados por Foc raza 1 y sus cambios con base en sintomatología en campo.

Palabras clave:

- **ANÁLISIS EXPLORATORIO DEL MICROBIOMA**
- **ILLUMINA MISEQ**
- ***FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE***

Abstract

Banana production in Ecuador is at risk due to the nearby presence of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4), which causes banana Fusariosis, a disease that devastates a great variety of banana and plantain cultivars. The objective of the present investigation was to taxonomically characterize the microbiota of banana Gros Michel plants symptomatic and asymptomatic for Fusariosis, to identify groups of microorganisms potentially suppressive against Foc TR4. Amplicon high-throughput sequencing reads were obtained from three environments (pseudostem, rhizome, and rhizosphere soil), the 16S subunit was considered for bacteria and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) for fungi. In asymptomatic plants, the genera *Pectobacterium*, *Klebsiella*, and *Candidatus Udaeobacter* dominated the bacterial microbiota of the pseudostem, rhizome, and rhizosphere, respectively. Metataxonomic analysis revealed that members of the *Gammaproteobacteria* and *Bacilli* classes occurred in higher relative abundance and differential abundance in asymptomatic plant tissue samples. Concerning the fungal community, *Ascochyta* and *Antrodia* were the main genera present in all environments regardless of symptomatology. *Fusarium oxysporum* and *Rhodotorula mucilaginosa* showed differential abundance in symptomatic samples and members of the *Ceratobasidiaceae* family in asymptomatic samples. This is the first field study in Ecuador that presents a comprehensive view of the microbiota of Gros Michel bananas affected by Foc race 1 and its changes based on symptomatology.

Key words:

- **MICROBIOME ANALYSIS**
- **ILLUMINA MISEQ**
- ***FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CUBENSE***

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La producción agrícola es uno de los factores fundamentales para lograr la seguridad alimentaria mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2017). Sin embargo, esta se encuentra amenazada por la degradación ambiental (contaminación química y radioactiva, deterioro de suelos y contaminación microbiana de recursos suelo y agua), el cambio climático y la aparición de plagas o enfermedades agrarias (Sundström et al., 2014).

Los bananos (*Musa* spp.) están clasificados como uno de los cultivos más significativos del mundo puesto que están distribuidos en aproximadamente 135 países de regiones tropicales y subtropicales (Liu *et al.*, 2019). América Latina y el Caribe se ubica como la principal región exportadora de banano y representa casi el 80% de las exportaciones mundiales (FAO, 2019).

Cabe destacar que Ecuador se ha posicionado como el principal exportador mundial de banano durante la última década, con un promedio anual de 6 millones de toneladas exportadas al mercado internacional representando 3 000 millones USD para el país (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019). Los bananos y sus productos derivados constituyen el segundo producto de exportación más importante del Ecuador después del petróleo (Magdama et al., 2020).

Lamentablemente la producción bananera del Ecuador se encuentra constantemente amenazada debido a la incursión de patógenos y la aparición de problemas fitosanitarios los cuales deterioran la capacidad productiva del país (Camino, 2018).

La Fusariosis del banano, o marchitamiento por *Fusarium* (FWB, por sus siglas en inglés *Fusarium Wilt of Banana*), es considerada una de las fitopatologías más destructivas de la historia y es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (Dita et al., 2018). Se conoce que a mediados del siglo XX, Foc raza 1 (Foc R1) acabó con la industria bananera de cultivares Gros Michel, mismos que fueron sustituidos por cultivares Cavendish, resistentes a Foc R1. Desde entonces la industria de exportación de banano se ha expandido rápidamente con base en Cavendish (Ploetz, 2005).

Desde la incursión de la Fusariosis del banano en Ecuador, en 1936, las poblaciones de Foc en el país han sido asociadas a un único Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) 0120 y caracterizado como Foc R1 (Magdama, 2019). No obstante, una nueva cepa de Foc, la raza 4 tropical (R4T), ataca los cultivares Cavendish y a una amplia gama de otras variedades de banano y plátano, por lo cual la diseminación de Foc R4T es motivo de gran preocupación (Dita et al., 2018).

El microbioma de las plantas juega un papel crucial en su desarrollo, salud y productividad ya que interviene en la adquisición de nutrientes, tolerancia a las condiciones de estrés e inducción de resistencia contra fitopatógenos (Liu et al., 2019; Massart et al., 2015). La microbiota endofítica corresponde a los microorganismos que colonizan y residen dentro o están estrechamente relacionados con los tejidos vegetales sin causar síntomas o enfermedades (Chutulo & Chalannavar, 2018), por lo que se ha explorado como agente de control biológico (CB) ya que promueve el crecimiento y la salud de las plantas (Kaushal, Mahuku, et al., 2020), a pesar de ello está poco estudiada (Proença et al., 2017).

Los agentes de CB aislados de lugares no nativos pueden ser infructuosos en campo, ya que no logran sobrevivir en el entorno del suelo local debido a factores ambientales circunstanciales (ej. pH, humedad, temperatura) o pueden no ser efectivos contra el patógeno local. Es por ello que se pone énfasis en la caracterización de los agentes de CB autóctonos del área donde serán aplicados (Cao et al., 2018).

El análisis de la comunidad microbiana mediante tecnologías avanzadas como la secuenciación de alto rendimiento permite explorar patrones de diversidad biológica asociados a plantas (Levy et al., 2018) y una caracterización profunda del rol de los microorganismos endófitos (Kaushal, Mahuku, et al., 2020).

Justificación del problema

La producción de banano en Ecuador está seriamente amenazada por FWB, enfermedad causada por el hongo Foc. El país enfrenta elementos de riesgo como: la producción intensiva del banano en monocultivo; la carencia de variedades resistentes; el alto número de productores; la falta de capacitación; y principalmente la presencia de Foc R4T en los países fronterizos Colombia (García-Bastidas et al., 2020) y Perú (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Perú [MIDAGRI], 2021). Lo cual hace imperativo mantener al hongo fuera del territorio ecuatoriano, por medio de la implementación de medidas de bioseguridad y estrategias de prevención y control (Magdama *et al.*, 2020), con el fin de salvaguardar la producción de más de 300.000 ha de Musáceas en el país (Sistema de Información Pública Agropecuaria [SIPA], 2021).

Foc R4T es un patógeno de fácil dispersión el cual posee la capacidad de vivir saprofiticamente en ausencia de su huésped primario, además puede persistir en el suelo en forma de esporas hasta por 30 años (Nishioka et al., 2019). El hongo no ha podido ser controlado por pesticidas y no se puede erradicar del suelo con fumigantes

(Dita et al., 2018). La búsqueda de un bioplaguicida de aplicación directa ciertamente subestima la complejidad de las interacciones suelo-patógeno-planta (Dita et al., 2018). Por ello han ganado popularidad investigaciones alternativas como el CB y la manipulación de la comunidad microbiana para la supresión del patógeno (Berg et al., 2016).

Los nuevos enfoques, como la metagenómica, han proporcionado avances significativos en la comprensión del microbioma de la planta y del suelo, para la identificación de microorganismos prometedores (Cha et al., 2016).

La "Iniciativa FUSARIUM, una plataforma multipropósito para la prevención y manejo de la Fusariosis raza 4 tropical en Ecuador - FASE I: Efectividad de productos desinfectantes y análisis de microbiomas asociados a banano" proyecto del cual la presente investigación es parte, busca reducir el riesgo de incursión de Foc R4T a través de la implementación de medidas de prevención adecuadas y desarrollo de tecnologías alternativas para el manejo sostenible de la Fusariosis del banano en el Ecuador. Así, este estudio pionero en el país abre un nuevo campo de búsqueda, mediante la caracterización del microbioma presente en los cultivos de banano Gros Michel infectados por Foc R1 con el fin de establecer perfiles taxonómicos asociados a plantas sintomáticas y asintomáticas para Fusariosis, información que permitirá comprender el rol del microbioma durante la interacción planta-patógeno y en la supresión de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo General

Determinar perfiles taxonómicos de la microbiota del suelo y tejido vegetal de banano Gros Michel en localidades afectadas por Fusariosis.

Objetivos Específicos

- Obtener lecturas de secuenciación de alto rendimiento de amplicones de la subunidad 16S y del espaciador transcrito interno 2 de ARN ribosomal.
- Utilizar pipelines bioinformáticos para obtener perfiles taxonómicos a partir de lecturas de secuenciación de alto rendimiento.
- Comparar los perfiles taxonómicos para establecer diferencias entre plantas sintomáticas y asintomáticas para Fusariosis.

Capítulo II: Marco teórico

Banano

La planta de banano (*Musa x paradisiaca*) es una hierba perenne (llamada mata) de tamaño similar a un árbol. Se la considera una hierba ya que no posee tejido leñoso y sus partes aéreas mueren y caen al suelo cuando termina la estación de cultivo, y perenne porque del rizoma surge un brote hijuelo (vástago) que reemplaza a la planta madre (Vézina et al., 2020).

Lo que parece ser el tronco de la planta es en realidad un pseudotallo, formado por un conjunto apretado de vainas foliares superpuestas (Karamura et al., 2011). El tallo 'verdadero' o tallo floral crece en el interior del pseudotallo y se compone de tres partes: el rizoma subterráneo, el tallo aéreo al que se adhieren las hojas y el pedúnculo que soporta a la inflorescencia, ver Figura 1 (Robinson & Galán, 2010).

Importancia agrícola

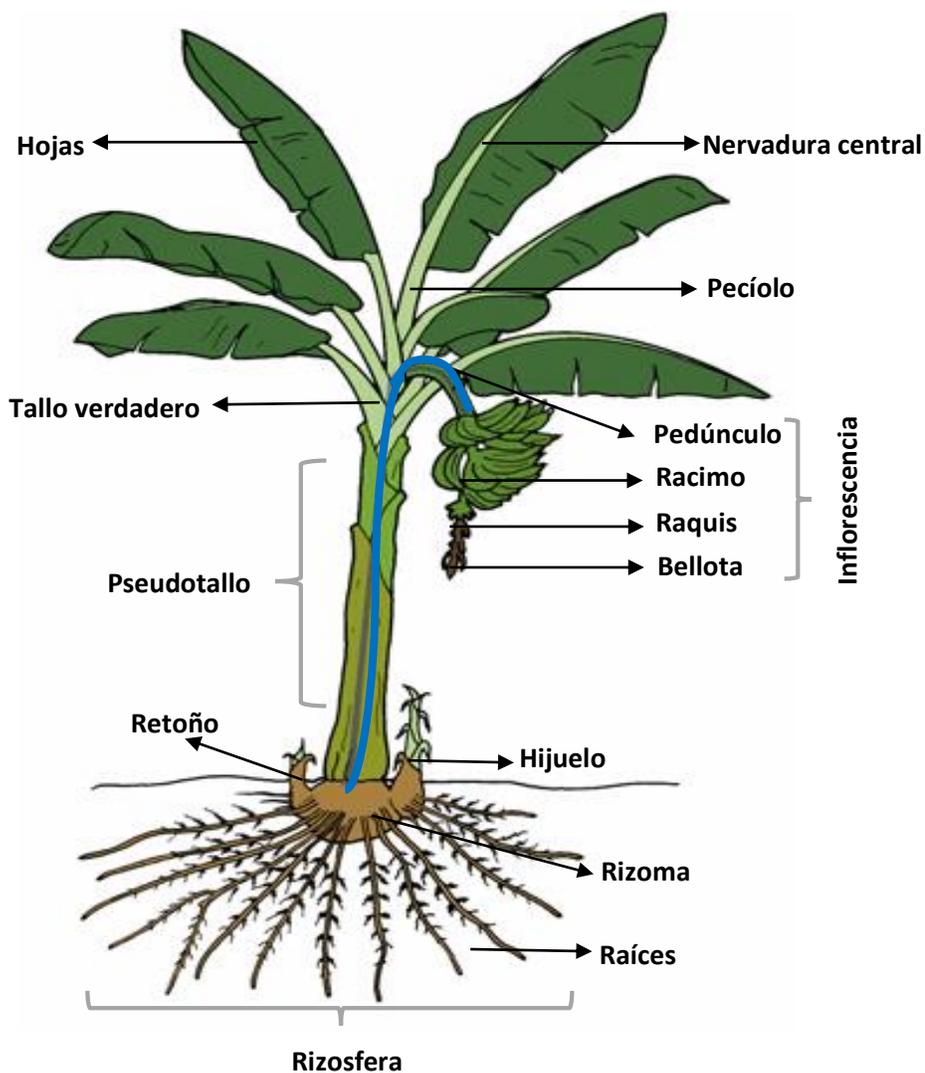
En 2019, la producción mundial de banano alcanzó los 116 millones de toneladas representando 5 millones de hectáreas de cultivo (FAOSTAT, 2021). Existen más de 300 cultivares de banano y plátano, la mayoría son híbridos y poliploides de dos especies silvestres, *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. Se clasifican en grupos y subgrupos según el grado de herencia genética de los padres silvestres y el número de cromosomas (ploidía) (Porcher, 2011).

Cabe señalar que solo 3 de los 50 subgrupos reconocidos de banano representan el 75% de la producción mundial actual, incluyendo los cultivares Cavendish (AAA), el subgrupo de plátano (AAB) y los bananos East African Highland (ABB) (Magdama et al., 2020). La mayoría de los plátanos cultivados carecen de semillas y por lo tanto son estériles (Brown et al., 2017). Las plantas de banano se multiplican por clonación a

través de retoños en el campo o en un vivero (macropropagación) o por cultivo *in vitro* (micropropagación) (Kaushal, Mahuku, et al., 2020).

Figura 1

Morfología de planta del banano, se aprecia el tallo verdadero (representación en turquesa) en el interior del pseudotallo.



Nota. Tomado de Véniza et al. (2020). Adaptado de Karamura et al. (2011).

Producción bananera en Ecuador

Ecuador, el principal exportador mundial de banano durante la última década, en 2020 suministró un máximo sin precedentes de 6,9 millones de toneladas al mercado internacional lo cual representa aproximadamente 3 600 millones USD para el país (FAO, 2020).

Los trabajadores de la industria bananera representan el 17% de la población económicamente activa, entre los cuales se encuentran 16,000 productores de banano y plátano, 200 exportadores de musáceas y diferentes actores involucrados en la cadena productiva a nivel nacional (SIPA, 2021). Hasta el 2019, la superficie cultivada reportada en Ecuador fue de 190,381 ha de banano, 160,262 ha de plátano y 5,861 ha de banano orito. Los ingresos generados por la actividad bananera representan el 3.84% del PIB total, el 50% del PIB agrícola y el 20% de las exportaciones privadas del país (Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador [AEBE], 2018).

Fusariosis del banano

Antecedentes

La FWB es una enfermedad fúngica letal causada por un hongo presente en el suelo (Damodaran et al., 2020; Maryani et al., 2019). Fue descrita por primera vez en 1876 en Australia, donde fueron observados síntomas de marchitez asociados con la muerte de las plantas de banano sin conocerse la causa o capacidad destructiva de la enfermedad (FAO, 2019; Magdama, 2019). El primer brote de FWB a gran escala en plantaciones de exportación se reportó en 1890 en Panamá, por ello la enfermedad es comúnmente conocida como “Mal de Panamá” (Kaushal, Mahuku, et al., 2020).

Fue hasta 1910 cuando E.F. Smith aisló por primera vez un hongo a partir del tejido sintomático de bananos procedentes de Cuba y lo nombró *Fusarium cubense*, sin

saber que se convertiría en una de las peores epidemias de plantas de todos los tiempos (Ploetz, 2005). Trabajos posteriores reclasificaron al hongo con el nombre de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* , “f.sp. *cubense*” hace referencia a cepas que causan enfermedad exclusivamente en banano (Magdama et al., 2020).

A mediados del siglo XX la Fusariosis se había propagado a nivel mundial eliminando miles de hectáreas del banano variedad Gros Michel, que en ese momento dominaba el comercio de exportación (FAO, 2019). En 1960 el descubrimiento de la variedad Cavendish resistente a la enfermedad sofocó la epidemia, lo cual conllevó a reemplazar los cultivares Gros Michel por Cavendish, difundiéndose por todo el mundo hasta alcanzar su predominio actual en el comercio mundial de banano (Hwang & Ko, 2004; Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria [OIRSA], 2017).

El riesgo de un monocultivo global es innegable y los problemas surgieron nuevamente a finales de la década de 1980 en Taiwán, cuando emergió la cepa denominada Foc R4T, recientemente renombrado *Fusarium odoratissimum* por Maryani y otros (2019) a la cual son susceptibles los cultivares Cavendish. Foc R4T ha sido reportado en todos los continentes, (Magdama et al., 2020) en más de 21 países, ver Figura 2.

Figura 2

Distribución mundial de la marchitez del banano por Fusarium



Nota. Código de colores: ● Foc R1 ● Foc R4T. Adaptado de Vézina et al. (2021).

La incursión de Foc R4T al continente americano marca un nuevo paradigma de peligro para la industria bananera y platanera de la región de América Latina y el Caribe. El hongo fue reportado por primera vez en el país vecino Colombia en 2019, afectando cultivares de banano Cavendish en la zona de la Guajira (frontera con Venezuela), donde se erradicaron 175 ha (García-Bastidas et al., 2020). En abril del presente año (2021) se confirmó la presencia de Foc R4T en Piura, ciudad de Perú (MIDAGRI, 2021).

Foc R4T plantea riesgos particularmente elevados para la seguridad alimentaria y generación de ingresos, ya que puede afectar una variedad mucho más amplia de cultivares de banano y plátano que las cepas anteriores (FAO, 2019). El hongo afecta a las variedades de banano Cavendish, las cuales representan el 45% de la producción mundial, a los plátanos (AAB), a los bananos de cocción tipo Bluggoe (ABB), así como otras variedades importantes para pequeños productores como Gros Michel (AAA),

Prata (AAB) y Manzano (AAB) (Magdama *et al.*, 2020; Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2019).

Fusariosis del banano en Ecuador

El primer reporte de la Fusariosis del banano en Ecuador fue en Guayas en 1936, siendo las poblaciones del hongo analizadas correspondientes a Foc R1 (Parsons, 1957). El reemplazo a gran escala de cultivares Gros Michel por Cavendish permitió realizar estrategias de cultivo intensivo, lo que conllevó a una reducción de las medidas preventivas frente a FWB. No obstante, Foc R1 sigue afectando a los pequeños agricultores que todavía cultivan Gros Michel o Manzano, principalmente para la subsistencia familiar y comercialización en mercados locales (Magdama *et al.*, 2020).

Actualmente, no se han presentado reportes de Foc R4T en Ecuador. El 03 de agosto de 2021, el Comité de Operaciones Especiales (COE) Nacional, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), colectivamente con actores públicos y privados de la cadena productiva de musáceas, instalaron mesas técnicas para la definición de un plan de emergencia que evite el ingreso de Foc R4T al país (MAG, 2021). Además, se ha aprobado la importación al país de variedades de banano tolerantes al patógeno (Alvarado, 2021).

Agente causal

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc) es un hongo haploide presente en el suelo con elevada persistencia y fácil transmisión (Ploetz & Evans, 2015). En el interior de la planta infectada Foc produce tres tipos de esporas asexuales: clamidosporas, microconidios y macroconidios (Ohara & Tsuge, 2004). Estas se producen en el tejido del huésped moribundo y se liberan al medio ambiente cuando los tejidos colapsan (Pegg *et al.*, 2019). Las clamidosporas son propágulos en reposo redondos de paredes

gruesas que pueden sobrevivir hasta por 30 años en el suelo (Köberl et al., 2017). Los microconidios son de una o dos células y tienen forma arriñonada, se producen con mayor frecuencia. Los macroconidios tienen forma de hoz, poseen de cuatro a ocho celdas y se encuentran en la superficie del pseudotallo de la planta muerta (Daly & Walduck, 2006). Foc posee reproducción estrictamente asexual, por lo que las esporas juegan un papel importante en el ciclo de la FWB, los macroconidios y microconidios sirven como inóculos secundarios para la propagación del hongo a las plantas hospedadoras vecinas, y las clamidosporas son órganos de resistencia en el suelo y actúan como inóculos primarios en presencia de plantas hospedadoras (Ohara & Tsuge, 2004).

Los aislados patogénicos de Foc se clasifican en razas en función de los cultivares en los que causan FWB, ver Tabla 1 (Dita et al., 2018; Ploetz & Evans, 2015). La raza 4 se subdivide en Subtropical (R4ST) y Tropical (R4T). Foc R4ST causa enfermedad en zonas subtropicales bajo condiciones de estrés o factores de predisposición como sequía y temperaturas bajas, por otro lado Foc R4T lo hace en zonas tropicales sin necesidad de estrés (Magdama et al., 2019).

Tabla 1

Clasificación de Foc en razas en función de principales subgrupos de banana

Raza	Subespecies o subgrupos susceptibles
Foc R1	Gros Michel (AAA), Manzano/Apple/Latundan (Silk, AAB), Pome (Lady Finger, AAB), Ducasse (Pinsang Awak, ABB), Sukari Ndizi (AAB) ^{a, b}
Foc R2	Bluggoe (ABB) ^{b, c}
Foc R4T	Todos los cultivares susceptibles a R1 y R2, Cavendish (AAA), Plátano(AAB) ^{a, c, d}

Nota. ^a Dita et al. (2018). ^b Pegg et al. (2019). ^c Karamura et al. (2012). ^d Ploetz & Evans (2015).

Etiología

La infección inicia cuando las clamidosporas germinan en respuesta a los exudados de las raíces de la planta. Posteriormente las hifas del hongo penetran en las raíces laterales colonizando los vasos del xilema y bloqueando el flujo de agua y nutrientes (Gordon, 2017). La progresión de la enfermedad da como resultado el colapso de las hojas en el peciolo, la división de la base del pseudotallo y, finalmente, la muerte de la planta (Magdama, 2019).

A diferencia de otros fitopatógenos que pueden ser controlados con fungicidas y que necesitan de una planta huésped para sobrevivir, Foc gracias a su capacidad saprófita puede sobrevivir en la materia orgánica y en tejido en descomposición, a pesar de que se elimine a su hospedero (Pegg et al., 2019). Además, Foc puede vivir inadvertido en asociación con huéspedes alternativos, como las Heliconias y malezas, lo cual contribuye a la sobrevivencia y persistencia del hongo en el suelo (Dita et al., 2018).

La dispersión de Foc ocurre por el contacto con material contaminado sea este, suelo, material vegetal infectado, herramientas, maquinaria, vehículos, zapatos y otros. El agua de escorrentía y agua contaminada de ríos usadas para riego también contribuyen a la dispersión del hongo (OIRSA, 2017). Por ello, es primordial la implementación de medidas de bioseguridad rutinarias en fincas para la limpieza de todo material y personal que entre o salga de las mismas (Ordóñez et al., 2015).

Foc es un patógeno característicamente difícil de controlar por diversas razones:

I. Es un hongo del suelo con una larga supervivencia debido a la generación de esporas que pueden permanecer en el suelo más de 20 años, inclusive en ausencia de su planta hospedadora o dentro de hospedadores alternativos los cuales no necesariamente muestran síntomas de la enfermedad (Hennessy et al., 2005). **II.** Siendo un patógeno vascular una vez que penetra en la planta, escapa al contacto de fungicidas no sistémicos o CB no endofítico; **III.** Puede diseminarse en el material de propagación vegetativa del banano, suelo, trabajadores, maquinaria, agua de riego, etc.; **IV.** El monocultivo de banano facilita su propagación, especialmente en el sistema Foc R4T/Cavendish (Bubici et al., 2019).

Sintomatología

Los síntomas prominentes en etapas iniciales de FWB son el amarillamiento y marchitez de las hojas desde los bordes hacia la nervadura central y la coloración marrón rojiza de los conductos vasculares (xilema) del pseudotallo. Dichos síntomas se producen debido a la obstrucción de los haces vasculares de la planta en respuesta a la infección y avance del patógeno, lo cual limita la translocación de agua y el proceso de fotosíntesis (Magdama, 2019).

En etapas avanzadas, las hojas se tornan totalmente amarillas y colapsan alrededor del pseudotallo, formando una característica “falda hawaiana”. Además, al

realizar un corte longitudinal en el pseudotallo se puede observar rajaduras y necrosis total de los haces vasculares (Gordon, 2017). Cabe mencionar, que los síntomas de la Fusariosis pueden confundirse con la Sigatoka negra, Ralstonia, daño por insectos o desórdenes nutricionales (INIAP, 2019).

Compatibilidad vegetativa

La clasificación de cepas de Foc también se realiza en grupos de compatibilidad vegetativa (GCV), basado en la capacidad de sus hifas para fusionarse y formar heterocariones estables (células que contienen dos núcleos distintos) (Ploetz, 2009). A nivel mundial existen 24 GCVs de Foc, cada GCV tiene sus propias características en términos de agresividad y de los cultivares de banano que ataca con mayor facilidad (Li et al., 2013). Aquellos asociados con R1 son GCV0120, GCV0126, GCV0125, GCV0124 y GCV01218, y con R4T GCV01213 y GCV01216 (Ordonez et al., 2015).

Manejo

Ya que no existen informes sobre la eliminación del patógeno, las medidas clave en el manejo de FWB son: la exclusión del patógeno, cuarentena, implementación de estrictas normas de bioseguridad en campo y diagnóstico oportuno, siendo fundamental evitar su propagación a áreas libres de la enfermedad (Bubici et al., 2019). Con base en la epidemiología del hongo y su naturaleza, Ploetz & Evans (2015) afirman al uso de cultivares resistentes como la única medida eficaz para sobreponerse a esta enfermedad. Sin embargo, estos cultivares resistentes pueden no cumplir con las demandas del mercado y la resistencia puede ser superada por nuevas cepas de patógenos (como fue el caso de Cavendish y Foc R4T).

Las principales prácticas de manejo de FWB están orientadas a mejorar la salud del suelo y su capacidad de supresión, como el uso de cultivos de cobertura, la rotación de

cultivos, aplicación de enmiendas orgánicas, fertilizantes orgánicos (compost) y enriquecimiento del suelo con agentes de biocontrol (Nishioka et al., 2019). Estrategias que deben ser aplicadas de manera integral junto con medidas de contención del patógeno y de bioseguridad, ya que su validación a escala de campo todavía es incipiente (Dita et al., 2018).

Agentes biológicos

Los cambios en la composición de la comunidad microbiana o la abundancia de subpoblaciones pueden ser indicadores de su capacidad de supresión de enfermedades, por lo cual, el manejo de la microbiota del suelo tiene un gran potencial para controlar las enfermedades transmitidas por el mismo (Wu et al., 2008). Los suelos “supresores” de enfermedades son aquellos en los que se suprimen determinadas patologías debido a la presencia de microorganismos antagónicos al patógeno causal (Shen et al., 2015). Su estudio permite comprender la interacción de los microorganismos responsables de la supresión y desarrollar herramientas de manejo eficientes (Weller et al., 2002).

Según Shen y colaboradores (2018) en la isla de Hainan, China, se han identificado huertos supresores que mantienen una baja incidencia de la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* del banano (<15%) durante años de producción consecutivos, junto con campos de alta incidencia de enfermedades.

El uso consciente de organismos vivos para el control de plagas, ha ganado gran interés en los últimos años debido a la considerable cantidad de plaguicidas que generan preocupaciones económicas, ambientales y de seguridad (Gordon, 2017).

Además de las variedades resistentes o el material de plantación libre de enfermedades, no existen otros métodos eficaces para el control de *Foc*. Debido a que el patógeno no puede ser controlado con fungicidas se ha investigado la aplicación del

CB en el sistema Foc/Banano. Principalmente en la agricultura orgánica donde el CB ha sido adoptado por el 1% de cultivos de banano (Liu & Prada, 2018). Sin embargo, el CB debería incluirse en los marcos integrados de gestión y prevención de enfermedades en sistemas agrícolas (Bubici et al., 2019). En Ecuador, la mayoría de los estudios de CB y productos en venta se basan en los géneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus* y *Trichoderma* (Riera, 2015).

Microbioma

Generalidades

Los varios enfoques existentes para definir una población en un medio ambiente proporcionan información específica (Arevalo et al., 2019). La **microbiota** es el conjunto de microorganismos vivos pertenecientes a diferentes reinos (procariotas y eucariotas) identificados taxonómicamente, que interactúan entre sí como una comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos un entorno (Hernández et al., 2020).

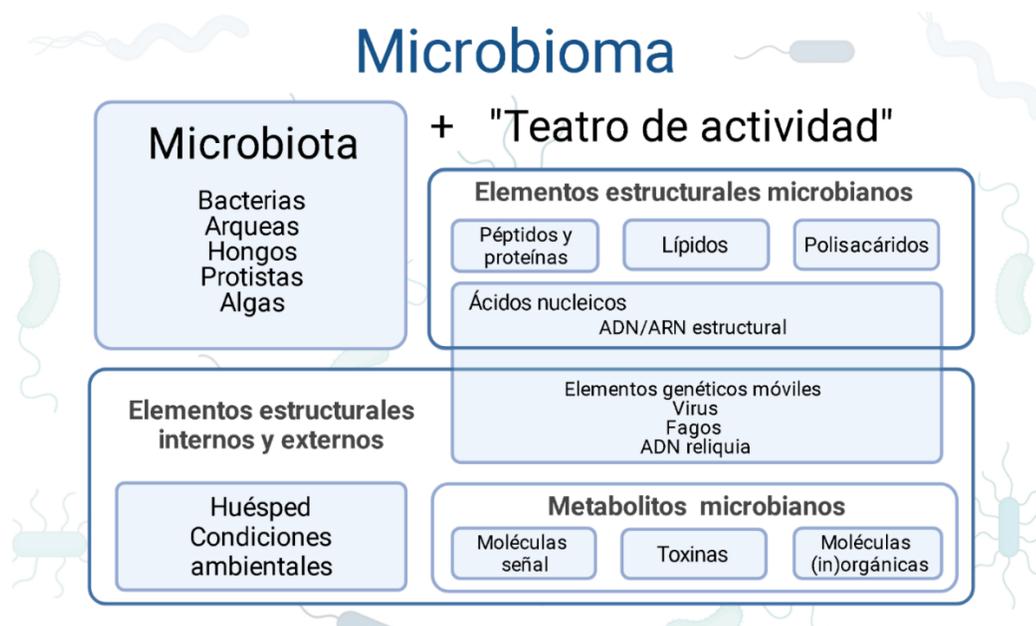
El **microbioma** se define como una comunidad de microorganismos ocupando un hábitat bien definido que tiene propiedades fisicoquímicas distintivas (formando un nicho ecológico). El microbioma engloba tanto a la microbiota en sí, como al "teatro de su actividad" (elementos estructurales, metabolitos y las condiciones ambientales circundantes, Figura 3) (Berg et al., 2020). Por otro lado, el **metagenoma**, hace referencia a la colección de genes y genomas de la microbiota, considera al microbioma incluido plásmidos y destaca el potencial genético de la población (Marchesi & Ravel, 2015).

Microbioma endofítico

Las plantas están habitadas por un gran número de microorganismos (bacterias, arqueas, hongos, virus y oomicetos), los cuales se pueden catalogar como patógenos o no patógenos. La asociación no patógena puede ser mutualista, beneficiosa, comensal o neutra, siendo los endófitos los protagonistas de la asociación beneficiosa (Fadiji & Babalola, 2020). Los endófitos son aquellos microorganismos que colonizan los tejidos de las plantas sin ejercer un efecto perjudicial, acceden a la planta a través del suelo rizosférico y colonizan los tejidos mediante métodos de transmisión horizontal y siembra vertical (Kaushal, Swennen, et al., 2020; Omomowo & Babalola, 2019; Rossmann et al., 2012).

Figura 3

Esquema de la composición del término microbioma



Nota. ADN: ácido desoxirribonucleico. ARN: ácido ribonucleico. Adaptado de Berg et al. (2020). Creado en BioRender.co.

El microbioma endofítico ha sido investigado con el fin de identificar grupos de microorganismos que contribuyan a la salud de las plantas y/o que supriman el establecimiento de patógenos, para así modular su composición hasta alcanzar microbiomas personalizados (Bulgarelli et al., 2013). Además, ha sido usado como agente de biocontrol ya que promueve el crecimiento y la salud de las plantas hospedadoras (Kaushal, Mahuku, et al., 2020).

Previo a su ataque, los fitopatógenos secretan una serie de enzimas líticas (pectinasa, xilanasa y celulasa) con el fin de romper la pared celular (compuesta principalmente de lignocelulosa). Los endófitos también rompen la barrera lignocelulósica para ingresar a la planta, pero lo hacen sin causar ningún síntoma negativo en el tejido del huésped (Solomon & Matthews, 2005).

Se ha reportado que las plantas hospederas reclutan microbiota beneficiosa específica después de las infecciones por fitopatógenos (Berg et al., 2016). El nivel de diversidad del microbioma se correlacionó directamente con la resistencia a enfermedades, debido a la competencia de recursos (Mallon et al., 2015). Otros mecanismos por los cuales estos microorganismos contribuyen al crecimiento de las plantas incluyen la producción de fitohormonas, la fijación de nitrógeno y la movilización como el fósforo y el hierro (Tkacz & Poole, 2015). La microbiota puede ser influenciada por diversos factores, principalmente el tipo de suelo, genotipo de la planta, pH, disponibilidad de nutrientes, contenido de agua / humedad y temperatura (Saad et al., 2020). Sin embargo, los fertilizantes, la rotación de cultivos, los pesticidas y el CB introducido artificialmente también desempeñan un papel representativo (Bubici et al., 2019).

Se conoce que la microbiota del suelo fluctúa con las etapas de crecimiento de las plantas, debido a cambios en los exudados de las raíces (Wang et al., 2017). Por

ejemplo, los exudados de las raíces de maíz contienen compuestos benzoxazinoídes los cuales desencadenan la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas putida* (bacteria promotora del crecimiento de las plantas) e inhiben el reconocimiento del hospedador y la virulencia del patógeno *Agrobacterium tumefaciens* (Hu et al., 2018).

Bubici y otros (2019) sugieren que los factores edáficos y antrópicos tuvieron un efecto más profundo y duradero en la microbiota de la rizosfera que una aplicación de CB artificial. Asimismo, la coinoculación de diferentes CB puede causar mayor impacto en la microbiota en comparación con la aplicación de una sola cepa (Grosch et al., 2012).

La aplicación de CB contra FWB (Foc R1 y cv. Grand Naine-AAA) fue probada usando diferentes combinaciones de endófitos (*Pseudomonas putida* C4r4, *Achromobacter* sp. Gcr1, *Rhizobium* sp. Lpr2 y *B. flexus* Tvpr1) y bacterias rizosféricas (*B. cereus* Jrb1, *P. putida* Jrb2, *Bacillus* sp. Jrb6 y Jrb7), obteniendo resultados favorables (Thangavelu & Gopi, 2015a). De igual manera inocularon *Trichoderma* sp. NRCB3 rizosférico combinada con *T. asperellum* prr2 endófito, lo que resultó en la reducción significativa de FWB y además aumentó el peso del racimo en comparación con las plantas no tratadas (control) (Thangavelu & Gopi, 2015b).

Liu y colaboradores (2019) estudiaron el microbioma del banano Cavendish en China e identificaron tres tipos de bacterias con un rol central en el desarrollo de la planta y una de ellas, perteneciente a *Enterobacter* sp., fue mejorada genéticamente y logró reducir la incidencia de Fusariosis en un 40% en ensayos de invernadero. En un estudio comparativo realizado entre plantas con síntomas y sin síntomas para Fusariosis en cultivos Gros Michel, se reportó que las plantas sanas presentaron un aumento de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, mientras que las plantas enfermas mostraron preferencia por *Enterobacteriaceae*. Además, la diversidad gamma

proteobacteriana y los miembros de la comunidad se identificaron como posibles indicadores de salud en las plantas asintomáticas (Köberl et al., 2017).

Metagenómica y Metataxonómica

El estudio de la estructura poblacional y la diversidad de los microorganismos presentes en cualquier ambiente con el fin de entender las relaciones biológicas y los procesos metabólicos involucrados, ha sido un reto para la comunidad científica (Fadiji & Babalola, 2020). En un inicio la identificación de los microorganismos dependía del cultivo *in vitro* para su posterior identificación (Castillo-Ortega et al., 2018). Sin embargo, se estima que el porcentaje de microorganismos cultivables se encuentra entre el 1 y 3% del total de la microbiota presente, siendo el 97% restante no cultivable debido a exigencias nutricionales difíciles de reproducir en el laboratorio, por lo tanto, su estudio depende únicamente del análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Handelsman, 2004).

Tras al apogeo de las técnicas de biología molecular y el desarrollo del método Sanger para la secuenciación de ADN, se logró la identificación de microorganismos (utilizando genes marcadores) y la obtención de genomas completos sin aislamiento previo, permitiendo la caracterización de una gran cantidad de secuencias codificantes y no codificantes que pueden usarse como marcadores filogenéticos (Escobar-Zepeda et al., 2015).

En 2005, con la aparición de la secuenciación masiva paralela surge la **metagenómica**, definida como el análisis de información genética a través de secuencias de ADN colectivo de los microorganismos pertenecientes a un ambiente, independientemente de su cultivo (Forbes et al., 2017). La metagenómica permite identificar todos los organismos presentes en un ecosistema, conocer la proporción relativa y distribución de los miembros de la microbiota, así como también las

interacciones entre comunidades microbianas (Berg et al., 2020), dejando de lado al organismo en su forma individual, para centrarse en los genes de la comunidad y cómo su presencia influye en los demás (Handelsman, 2004). Marchesi y Ravel (2015) han sugerido la aplicación del término metagenómica únicamente cuando dicha información genética ha sido obtenida mediante secuenciación *shotgun*.

Por otro lado, la **metataxonómica**, es el proceso de alto rendimiento utilizado para caracterizar taxonómicamente toda la microbiota de un ambiente, se basa en la amplificación y secuenciación de genes marcadores taxonómicos (secuenciación por amplicones) (Marchesi & Ravel, 2015).

Las herramientas ómicas han provisto de información valiosa acerca de los genes relacionados en los procesos de promoción del crecimiento de plantas y en el reclutamiento microorganismos benéficos (Martino et al., 2018). Junto con el progreso de la metagenómica se han desarrollado métodos computacionales y bases de datos para la comprensión de la composición genética y de las actividades de las comunidades microbianas, las cuales no han sido completamente caracterizadas debido a su complejidad (Castillo-Ortega et al., 2018).

Extracción de ADN

El muestreo y la obtención de ADN de buena calidad son los pasos iniciales y cruciales para llevar a cabo el análisis metagenómico. La calidad del ADN se ve influenciada por los diferentes métodos de muestreo, por lo cual, se recomienda utilizar el mismo método de muestreo para todo el experimento (Ju & Zhang, 2015). Previo a realizar la extracción de ADN, las muestras de plantas deben ser lavadas y esterilizadas superficialmente. Algunos de los kits de extracción de ADN utilizados frecuentemente para el análisis de comunidades microbianas asociadas a las plantas son: E.Z.N.A. SP plant DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) y Qiagen DNeasy Plant pro Kit (Qiagen, USA)

(Pipan et al., 2018). Una vez completa la extracción de ADN es necesario valorar su calidad (integridad, concentración y pureza), mediante electroforesis en gel de agarosa y por espectrofotometría con equipos como el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Las muestras finales de ADN purificado deben almacenarse a -20 °C o -80 °C hasta su posterior procesamiento (Bareither et al., 2013).

Secuenciación de alto rendimiento

El término secuenciación masiva o de alto rendimiento (*High-Throughput Sequencing*, HTS) hace referencia a las tecnologías diseñadas para analizar gran cantidad de ADN de forma masiva y paralela (Fadiji & Babalola, 2020) en un menor lapso de tiempo y a menor costo por base nucleica (Rubio et al., 2020).

Los protagonistas de la HTS son los métodos de secuenciación de segunda generación o comúnmente conocidos como próxima generación (*Next generation sequencing*) (Slatko et al., 2018). Se caracterizan por realizar secuenciación por síntesis, donde las moléculas de ADN son amplificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*, [PCR]) o mediante amplificación isotérmica modificada de "círculo rodante". Durante la síntesis los nucleótidos marcados o las reacciones químicas basadas en la incorporación de un nucleótido concreto pueden ser detectados y registrados (Metzker, 2009).

Una de las tecnologías HTS mayormente empleadas es Illumina, una plataforma de secuenciación por síntesis en grupos (*clusters*) y "amplificación en puente" o PCR- puente (Hernández et al., 2020). La secuenciación de Illumina es compatible con una variedad de protocolos que incluyen la secuenciación genómica, secuenciación de exomas, secuenciación dirigida o por amplicones, metagenómica, secuenciación de ARN, CHIP-seq y análisis de metiloma (Slatko et al., 2018). Illumina permite combinar múltiples muestras equimolecularmente en un solo *pool* de secuenciación (*multiplexear*)

y obtener una alta cobertura de secuencia por cada muestra. Además, puede detectar miembros de muy baja abundancia en la comunidad microbiana que pueden pasarse por alto o son demasiado costosos para identificar con otros métodos, generándose millones de lecturas las cuales deben ser separadas (*demultiplexear*) para su análisis (Degnan & Ochman, 2012).

El flujo de trabajo de Illumina inicia con la preparación de librerías, la cual consiste en la adición de adaptadores y códigos de barras (*barcodes*) a ambos extremos de cada uno de los fragmentos de ADN a secuenciar (insertos), con el fin de “etiquetar” cada muestra. Los insertos marcados se anclan a un soporte sólido de vidrio (*flow cell*), el cual contiene las secuencias complementarias a los adaptadores.

Posteriormente, el ADN es sometido a rondas sucesivas de amplificación y los nucleótidos se van incorporando por complementariedad a la hebra molde (Slatko et al., 2018). Los nucleótidos están marcados con fluoróforos (diferente para cada base) que bloquean de forma reversible la elongación de la cadena, tras la incorporación del nucleótido el fluoróforo es excitado y su emisión lumínica es registrada por los dispositivos ópticos del equipo, solo se añade un nucleótido por ciclo y tras la eliminación del mismo comienza un nuevo ciclo de amplificación (Jauk, 2019).

Después de secuenciar la hebra de ADN *forward*, las lecturas se registran y el proceso se repite para la hebra reverse, de manera que las dos secuencias se superponen en una longitud suficiente para que se combinen (~40 pb) convirtiéndose en una sola secuencia, por lo cual se llaman lecturas de extremo emparejado (*paired-end*) (Illumina, 2021).

El portafolio de máquinas de secuenciación de Illumina proporcionan distintos niveles de rendimiento, los principales modelos son: MiniSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq y HiSeq (Slatko et al., 2018). El secuenciador MiSeq fue lanzado al mercado

en 2011, es el más apropiado para microbiología, puede cubrir una longitud de hasta 600 pb usando secuenciación de extremos emparejados (2 × 300 pb o 2 × 250), genera 25 millones de lecturas, un rendimiento de 15Gb y posee una exactitud de lectura del 99.9% (Hernández et al., 2020; Jauk, 2019).

Secuenciación por amplicones

La secuenciación dirigida o basada en amplicones permite inferir la diversidad microbiana mediante análisis de marcadores genéticos, que sirven como indicadores de la presencia de microorganismos (Prodan et al., 2020). Se considera un gen específico presente en todos los organismos objetivo, el cual debe estar bien caracterizado, entendido y debe haber registros del mismo disponibles en bases de datos (Clarridge & III, 2004).

El gen necesita tener dos particularidades, regiones de alta conservación rodeando regiones de alta variabilidad, las regiones de alta conservación son usadas para el diseño de cebadores (*primers*) y las de alta variabilidad para la clasificación filogenética de géneros o especies en diversas poblaciones microbianas (Castillo-Ortega et al., 2018).

La secuenciación por amplicones permite un análisis rápido, de bajo requerimiento de biomasa y es aplicable a muestras contaminadas con ADN del hospedero. Además, permite descifrar la filogenia y taxonomía de microbiomas en entornos complejos y difíciles de estudiar. Entre sus limitaciones están posibles sesgos y errores debido a la PCR o *primers*, su resolución generalmente se limita a género y se pueden presentar falsos positivos en muestras con baja biomasa (Liu et al., 2020). Se deben considerar dos medios notables de contaminación: I. El material genómico de los microorganismos y el ADN de la planta presente en la muestra, los cuales no son el

objetivo principal de los estudios metataxonómicos; **II.** Los cebadores y las quimeras que se producen debido a los pasos de amplificación previa (Fadiji & Babalola, 2020).

Los genes más utilizados son el ADN ribosomal (ADNr), ADNr 16S para procariontes y espaciadores transcritos internos (*Internal transcribed spacers*, ITS) y/o ADNr 18S para eucariotas y arqueas (Mbareche et al., 2020). El gen del ADNr 16S tiene una longitud de aproximadamente 1500 pb y con nueve regiones hipervariables (V1-V9) intercaladas entre regiones conservadas (Kaushal, Mahuku, et al., 2020). La región hipervariable del gen ITS2 está flanqueada por los genes conservados de las subunidades 5.8S y 28S (Vancov & Keen, 2009).

Análisis bioinformático

El análisis bioinformático es el uso de herramientas matemáticas, estadísticas y computacionales para la interpretación de datos biológicos, precisa de servidores de alta gama (Escobar-Zepeda et al., 2015). Requiere conocimientos básicos en lenguajes de programación (ej. Bash, Python y R) y habilidades en el uso de sistemas operativos basados en UNIX®, como Linux y MacOS® (Hernández et al., 2020).

Ya que la variedad de programas con interfaz gráfica es limitada, el verdadero poder de estas plataformas reside en el uso de la terminal. Por ello, son necesarios conocimientos de programación y secuencias de comandos, para ejecutar e instalar softwares disponibles (la mayoría de licencia y código libres) enfocados al análisis de datos de secuenciación masiva (ej. QIIME, MOTHUR y el paquete de R DADA2) (Hernández et al., 2020; Rausch et al., 2019).

Una etapa primordial del análisis bioinformático es la organización de las lecturas (*reads*) en grupos (*clusters*). El agrupamiento de secuencias tradicional se basa en la similitud entre las mismas (generalmente > 97%) asociándolas a una secuencia

consenso representativa, también llamada unidad taxonómica operacional (*Operational taxonomic units*, OTU) (McLaren & Callahan, 2018).

Por otro lado, si se considera la frecuencia con la que es observado cada dato y las diferencias exactas entre secuencias, se pueden modelar los errores con los que se encontrarán diferencias entre cada grupo y mediante el establecimiento de un umbral limite (*threshold*) se determinará a partir de qué porcentaje de similitud se debe o no considerar como error. Así, ya no se trata de una secuencia consenso como en OTUs, sino es una variante de secuencia de amplicón (*Amplicon secuencia variant*, ASV), una secuencia exacta y confiable (Callahan et al., 2017). El uso de ASVs permite la adición posterior de nuevas secuencias y la comparación con estudios independientes, puesto que al tratarse de secuencias puntuales no es necesario agruparlas ni sufren modificaciones. Este nuevo enfoque está ganando popularidad en la comunidad científica, ya que se obtienen tablas de ASVs con mayor resolución que las tradicionales tablas de OTUs (Kuźniar et al., 2020; Luz, 2019; Sudarshan et al., 2018).

En un intento de mitigar los retos que presenta en análisis de datos de HTS, estos pueden ser normalizados (McKnight et al., 2019; McMurdie & Holmes, 2014). La **normalización** es el proceso de corregir las diferencias en la profundidad de lectura (eliminar artefactos) entre muestras, con el fin de permitir una comparación significativa y precisa entre los estadísticos de diferentes mediciones (Benitez et al., 2021). Por ejemplo, pueden existir sesgos (que no reflejan una verdadera diferencia en la biología) debido a variaciones en el muestreo, preparación de bibliotecas y/o secuenciación. La eliminación de muestras de baja profundidad del análisis está respaldada por el reciente descubrimiento de que las pequeñas muestras de biomasa son de peor calidad y contienen una mayor proporción de secuencias contaminantes (Weiss et al., 2017).

Pipeline

Para comprender e interpretar los datos resultantes de HTS se debe ejecutar un *pipeline* bioinformático, una serie de múltiples *softwares* los cuales se combinan para llevar a cabo un análisis secuencial (el *output* de un programa es el *input* del siguiente programa) (Mbareche et al., 2020).

El flujo de trabajo que comúnmente sigue un *pipeline* para el análisis de datos de secuenciación por amplicones es:

- I. Control de calidad
- II. Pretratamiento de los datos y filtrado
- III. Determinación de ASVs/OTUs
- IV. Asignación taxonómica a ASVs/OTUs usando una base de datos apropiada
- V. Generación de Tabla de abundancias de ASVs/OTUs
- VI. Análisis exploratorio de datos del microbioma
- VII. Normalización en dependencia del análisis (Por proporción, Transformación estabilizadora de varianza, Escala de suma acumulada y la menos recomendada Rarefacción) (Benitez et al., 2021).
- VIII. Evaluación de la ecología microbiana (diversidad α y diversidad β)
- IX. Análisis estadísticos (Luz, 2019; McMurdie & Holmes, 2014; Prodan et al., 2020).

Previo al pretratamiento de los datos, es recomendable obtener un rápido resumen estadístico de la calidad de los datos crudos de secuenciación utilizando FASTQC, una herramienta de control de calidad (*Quality control*, [QC]) para datos de HTS. Donde se evalúa la calidad de las bases, el contenido de CGs, la calidad de las secuencias en base al “*Phred Score*”, las bases ambiguas, la longitud, los niveles de

duplicación de secuencias, el contenido de adaptadores y secuencias sobrerrepresentadas (Trivedi et al., 2014).

Con el fin de obtener lecturas de alta calidad para el análisis posterior es trascendental realizar un pretratamiento a los datos crudos. Algunas de las plataformas informáticas para este fin son, el software TRIMMOMATIC, RDP y UCHIME (Abubakr et al., 2019). La importancia del pretratamiento de los datos secuenciados incluye: la eliminación de *linkers* y adaptadores; la eliminación de réplicas y quimeras; el *demultiplexado* de las muestras en base a *barcodes*; y QC (Fadiji & Babalola, 2020).

Bioconductor es un software bioinformático de código y desarrollo abierto que proporciona herramientas para el análisis y la comprensión de datos genómicos de alto rendimiento, utiliza el lenguaje entorno y lenguaje de programación R (Callahan et al., 2019). **DADA2** (github.com/benjjneb/dada2), un paquete de R, es una herramienta de inferencia de muestras de alta resolución a partir de datos de secuenciación por amplicones de Illumina. DADA2 (disponible a través de Bioconductor) posee un algoritmo basado en desenmascaramiento de amplicones divisivos (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*, [DADA]) pudiendo modelar y corregir los errores (Callahan et al., 2016).

La composición de la muestra se infiere dividiendo las lecturas de amplicones en particiones consistentes con el modelo de error. DADA2 implementa un flujo de trabajo completo: inspección de perfiles de calidad, filtrado, desreplicación, inferencia de muestras, identificación y remoción de quimeras, fusión de lecturas de extremo pareado y asignación taxonómica. El producto final es una tabla de ASVs la cual registra el número de veces que se observó cada variante de secuencia de amplicón exacta en cada muestra (Callahan et al., 2017).

La asignación taxonómica de cada uno de los ASVs se realiza por comparación frente a anotaciones disponibles en bases de datos de los diferentes niveles taxonómicos (dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género y especie) (Luz, 2019). La selección de la base de datos debe considerar que ésta contenga secuencias similares a la región de ADN que se quiera analizar en la investigación. Entre las bases de datos comúnmente utilizadas se encuentran: SILVA, RDP, Greengenes, NCBI y UNITE (Balvočiūtė & Huson, 2017).

Análisis exploratorio de datos del microbioma

Los ASVs obtenidos se analizan para conocer las características de la ecología microbiana, análisis multivariados, abundancias diferenciales, análisis taxonómicos y pruebas estadísticas utilizando herramientas bioinformáticas (Mbareche et al., 2020). Existen varios paquetes de R en Bioconductor, como metagenomeSeq, phyloseq, vegan, ampvis, phangorn, metacoder, DECIPHER, los cuales están diseñados para facilitar la integración de elementos adicionales (ej. árboles filogenéticos) a las tablas de abundancia en el análisis microbioma (McMurdie & Holmes, 2013).

La librería de R Metacoder permite la elaboración de “árboles de calor”, una visualización filogenética diferencial en función de la abundancia significativa de taxones, utilizando el color y el tamaño de los nodos y aristas. La coloración indica las diferencias significativas entre las proporciones medias de las lecturas de diferentes tratamientos (Foster et al., 2017).

Ecología microbiana

La diversidad del microbioma es un indicador importante de las condiciones del ecosistema, asociándose una mayor diversidad de microbioma con un mejor estado de salud de la planta (Kaushal, Mahuku, et al., 2020). La **diversidad Alpha** (α) considera la

complejidad en un ambiente inherente de una muestra y se establece cuantificando la riqueza de la misma. Analiza el número de especies diferentes presentes en un ambiente (*richness*), la diversidad relativa observada de las distintas especies (*diversity*) y la heterogeneidad de las diferentes especies en la muestra (*evenness*) (Calle, 2019), a través de índices de ecología, entre los principales: Chao1, Shannon y Simpson (Hernández, 2019).

Por otro lado, la **diversidad Beta** (β) compara entre ambientes o condiciones de muestreo diferentes, es decir mide la distancia ecológica entre muestras. Las distancias más utilizadas son Chi-cuadrado, Bray-Curtis (método no filogenético que tiene en cuenta la abundancia de ASVs) y UniFrac (método filogenético). UniFrac es el porcentaje de la longitud de la rama observada que es único para cada muestra, existen dos enfoques: UniFrac no-ponderado (*unweighed* UniFrac) tiene en cuenta solamente la presencia o ausencia de ASVs y UniFrac ponderado (*weighed* UniFrac) que considera la abundancia relativa de los ASVs (Lozupone et al., 2010). La diversidad Beta se puede visualizar gráficamente mediante métodos de ordenación, los más utilizados en análisis de microbioma son el análisis de coordenadas principales usando las distintas métricas mencionadas (Principal coordinates analysis, [PCoA]), también conocido como escalado multidimensional, y el escalado multidimensional no métrico (Non-metric multidimensional scaling, [NMDS]) (Luz, 2019).

Inferencia estadística del microbioma

Un enfoque comúnmente utilizado en el estudio de la diversidad implica la realización de una etapa de reducción de la dimensionalidad (2D o 3D) con el fin de comparar ambientes entre diferentes grupos de muestras, tales como NMDS, PCoA, ANOSIM, entre otros (Garrido, 2017).

El análisis de varianza permutacional multivariante (PERMANOVA) es uno de los métodos más utilizados en el análisis comunitario multivariado, consiste en un ANOVA basado en disimilitudes en las matrices de distancia (Mbareche et al., 2020). La hipótesis nula formulada es que no hay diferencias en la composición entre grupos. PERMANOVA está disponible en la función “adonis” del paquete vegan en R. La variabilidad dentro de los grupos se compara con la variabilidad entre grupos con el estadístico ANOVA F habitual, pero la partición de sumas de cuadrados se aplica directamente a las diferencias. La significancia se evalúa mediante permutaciones para generar una distribución del pseudo estadístico F bajo el valor nulo (Anderson, 2017).

Abundancia diferencial

Otro paso importante en el análisis consiste en la identificación de OTUs/ASVs que son diferencialmente abundantes en dos tratamientos con condiciones diferentes. Hay dos pruebas paramétricas disponibles para tales análisis de recuento: la distribución Gaussiana cero-inflado en MetagenomeSeq (Mbareche et al., 2020) y la prueba de Wald binomial negativa en DESeq2 (Love et al., 2014).

Hipótesis

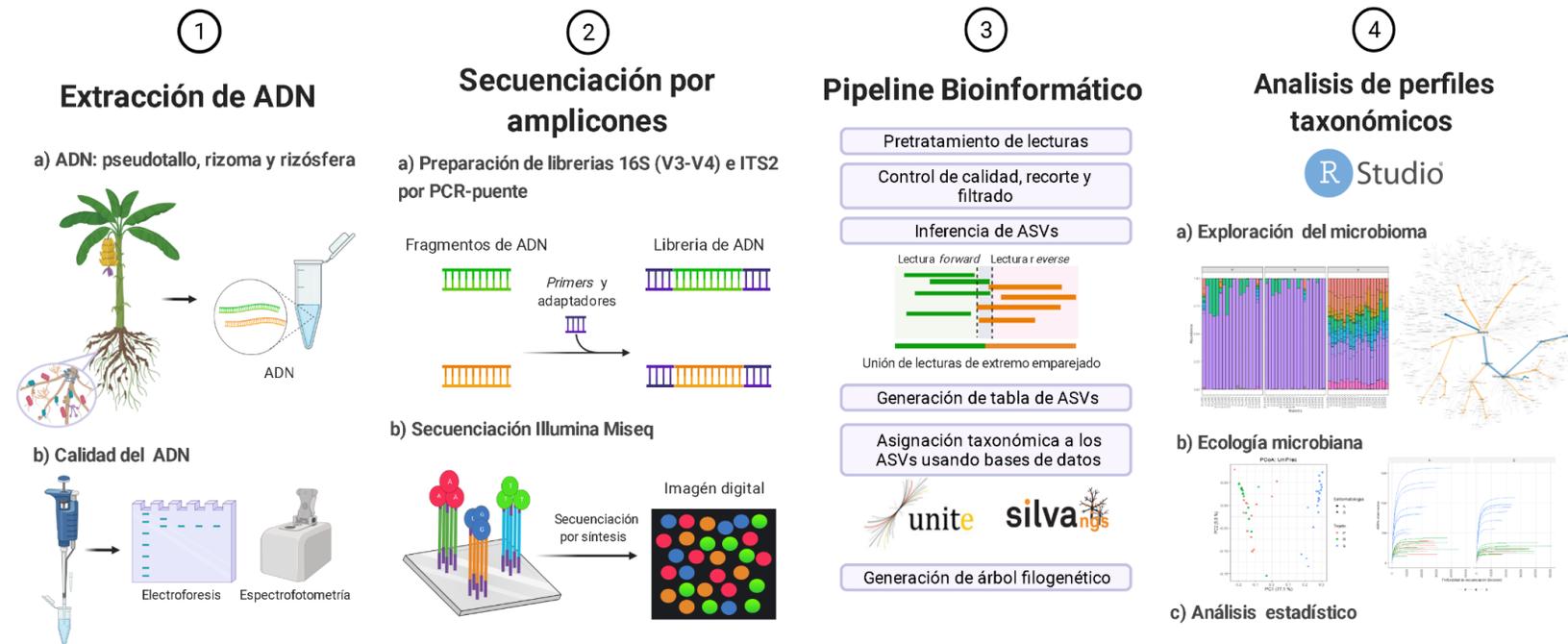
Existen géneros con abundancia relativa significativamente distinta al comparar los perfiles taxonómicos de plantas de banano Gros Michel sintomáticas y asintomáticas para Fusariosis.

Capítulo III: Materiales y Métodos

El flujo de trabajo del análisis Metataxonómico desarrollado en la presente investigación se describe en la Figura 4.

Figura 4

Flujo de trabajo del presente proyecto de titulación



Nota. Adaptado de Kaushal, Mahuku, et al., (2020), Luz (2019) y Popovic et al. (2017). Creado en BioRender.co.

Muestreo

Se identificaron cultivos de banano variedad Gros Michel infectados por Foc R1 en dos localidades (Tabla 2) ubicadas en el catón Caluma, provincia de Bolívar, Ecuador (Figura 5). Se consideraron dos localidades con fines comparativos donde se encontraron plantas con síntomas morfológicos (hojas amarillentas y líneas marrones en pseudotallo) junto a plantas sin síntomas (visiblemente sanas). Se eligieron cinco plantas sintomáticas y cinco plantas asintomáticas por cada localidad, en total 20 plantas (Figura 6).

Tabla 2

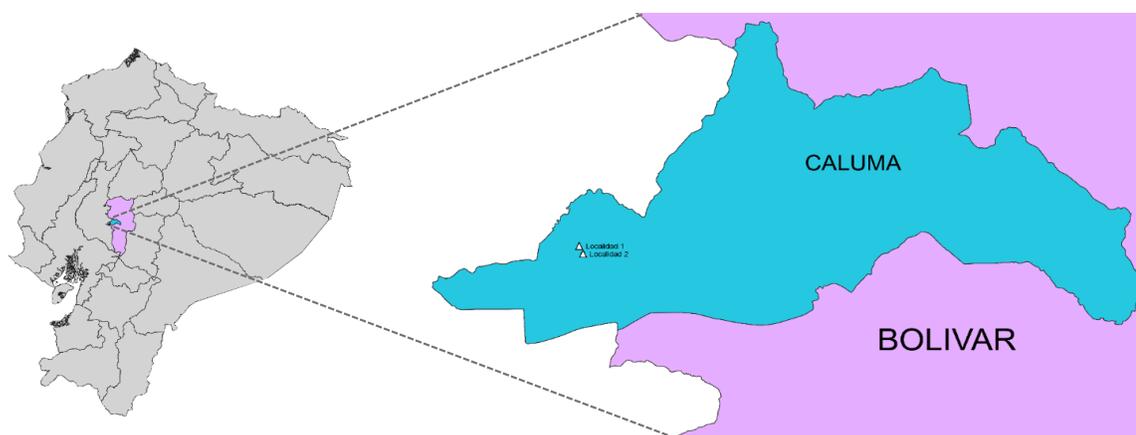
Coordenadas de la ubicación del muestreo

Localidad	UTM 17 S Norte	UTM 17 S Este	Altitud (m.s.n.m)
1	9820359	689046	252
2	9820400	689019	231

Nota. UTM: Universal Transversal de Mercator. Tomadas con GPS.

Figura 5

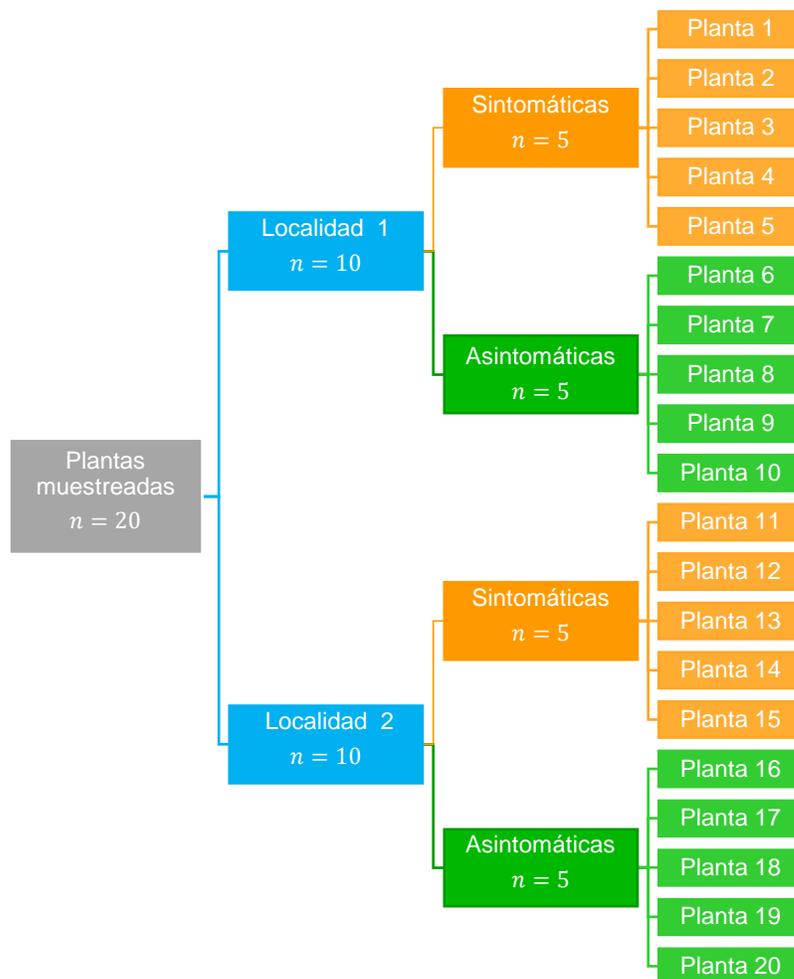
Ubicación geográfica del área de muestreo



Nota. Creado en QGIS v3.20.1

Figura 6

Esquema del muestreo realizado



Usando un sacabocados (10 cm), previamente desinfectado con etanol al 80%, se tomaron muestras de rizoma, pseudotallo (a 1,5 m del nivel del suelo) y suelo de la rizosfera de cada una de las 20 plantas, obteniendo un número final de 60 muestras ($n = 60$). Los tejidos de pseudotallo y rizoma fueron preservados empleando ácido cítrico al 1%. Las muestras fueron transportadas en frío al laboratorio y finalmente almacenadas a 4°C hasta su procesamiento (Kaushal, Swennen, et al., 2020).

Nomenclatura de muestras

Se estableció una nomenclatura en base a dígitos, en la cual cada dígito describe las características de la muestra (Tabla 3).

Tabla 3

Nomenclatura descriptiva en base a dígitos

Número de dígito	Nomenclatura	Descripción
1	1	Sintomática
	0	Asintomática
2	M	Muestra
	P	Pseudotallo
3	R	Rizoma
	S	Rizosfera
4	1	Localidad 1
	2	Localidad 2
5	1	Número de planta
	2	
	3	
	20	

Por ejemplo, la muestra 1MP11 corresponde a una planta sin síntomas, tejido pseudotallo, localidad 1 y número de planta 1.

Extracción de ADN

La extracción de ADN total de los tejidos (pseudotallo y rizoma) se realizó usando el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, 2019). Previo a la extracción de ADN, las muestras de tejido fueron lavadas con agua destilada durante 2 min. Utilizando material estéril se cortó 500 mg de muestra y se almacenó a -20°C en microtubos de 1.5 mL con y sin perlas de vidrio. Al día siguiente el tejido fue macerado en frío en presencia de 50 mg de polivinilpirrolidona, la maceración se realizó empleando BeadBetaer y micropistilo previamente enfriado (Sahu et al., 2012). Posteriormente, se continuó con las instrucciones del Kit. La extracción de ADN total de rizosfera (suelo) se realizó usando el Kit FastDNA™ Spin Soil (MPbio, 2021), líder comercial en la extracción y aislamiento de ADN metagenómico a partir de muestras de suelo (Bollmann-Giolai et al., 2020). Usando un bisturí estéril se realizó un raspado de la superficie de las raíces tomando 500 mg de suelo de la rizosfera y se procedió con las instrucciones del Kit. El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta su ulterior uso.

Con el propósito de reflejar la heterogeneidad microbiana de la muestra, se realizaron varias repeticiones ($R = 3 - 5$) de los ensayos de extracción de ADN por cada muestra ($n = 60$), las cuales posteriormente fueron unificadas obteniendo una muestra compuesta (Ju & Zhang, 2015).

Evaluación de la calidad del ADN

La valoración de la calidad del ADN extraído (integridad, concentración y pureza) se realizó mediante electroforesis y espectrofotometría.

Electroforesis de ADN

La evaluación de la integridad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó una solución tampón de trabajo 1X de TBE

(pH 8.0) compuesta por Tris Base, ácido bórico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se almacenó a temperatura ambiente. Los geles de agarosa se prepararon al 1%, usando Agarose abm®, buffer TBE 1X y Bromuro de Etidio AMP. El marcador de peso molecular usado fue 100 pb Opti-DNA Marker abm®. Se cargaron 5 µL de las muestras de ADN extraído con Blue Juice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen). Las corridas electroforéticas (hacia el ánodo) se realizaron a 100 V durante 30 min. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Espectrofotometría NanoDrop™ 2000c

La cuantificación y valoración de la pureza del ADN extraído se realizó usando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c, siguiendo las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific). Se usó como blanco las soluciones de elución final de cada Kit. Se registraron los cromatogramas resultantes, las concentraciones (ng/µL) y las calidades (A260/A280 A260/A230).

Secuenciación masiva paralela

Se empleó la plataforma Illumina MiSeq de extremo emparejado, 2 × 300 pb, con aproximadamente 70 000 lecturas por muestra, en la empresa BioSequence EC, Quito Ecuador. Se utilizó la metodología de secuenciación masiva paralela por amplicones de Illumina, la cual se puede generalizar en cuatro pasos: **1)** Obtención y purificación de ADN, **2)** Preparación de librerías: Amplificación por PCR de dos pasos, primero usando *primers* que flanqueen el marcador genético de interés y segundo el marcaje con *barcodes* y adaptadores de Illumina (Rubio et al., 2020), **3)** Secuenciación o lectura de los fragmentos de ADN, y **4)** Análisis bioinformático de datos (Illumina, 2021).

Para el análisis de la comunidad bacteriana, se utilizó el par de *primers* 341F / 806R dirigido a la regiones V3-V4 del gen ADNr 16S (Kaushal, Swennen, et al., 2020;

Rausch et al., 2019). Por otro lado, para el análisis de la comunidad fúngica, se utilizaron los *primers* ITS86F / ITS4 para amplificar la región ITS2 del operón de rRNA (Kaushal, Swennen, et al., 2020; Voříšková et al., 2019), descritos en la Tabla 4. Se realizó la preparación de librerías empleando los *primers* seleccionados y las muestras compuestas de ADN extraído ($n = 60$). Se usaron los protocolos: “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” (Illumina, 2018) y “Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol” (Illumina, 2019), para secuenciación del gen de rRNA 16S e ITS2, respectivamente. Las lecturas fueron separados en archivos formato “fastq” individuales para cada muestra (demultiplexación basada en *barcodes*).

Tabla 4

Primers usados en la preparación de librerías para secuenciación por amplicones en Illumina Miseq

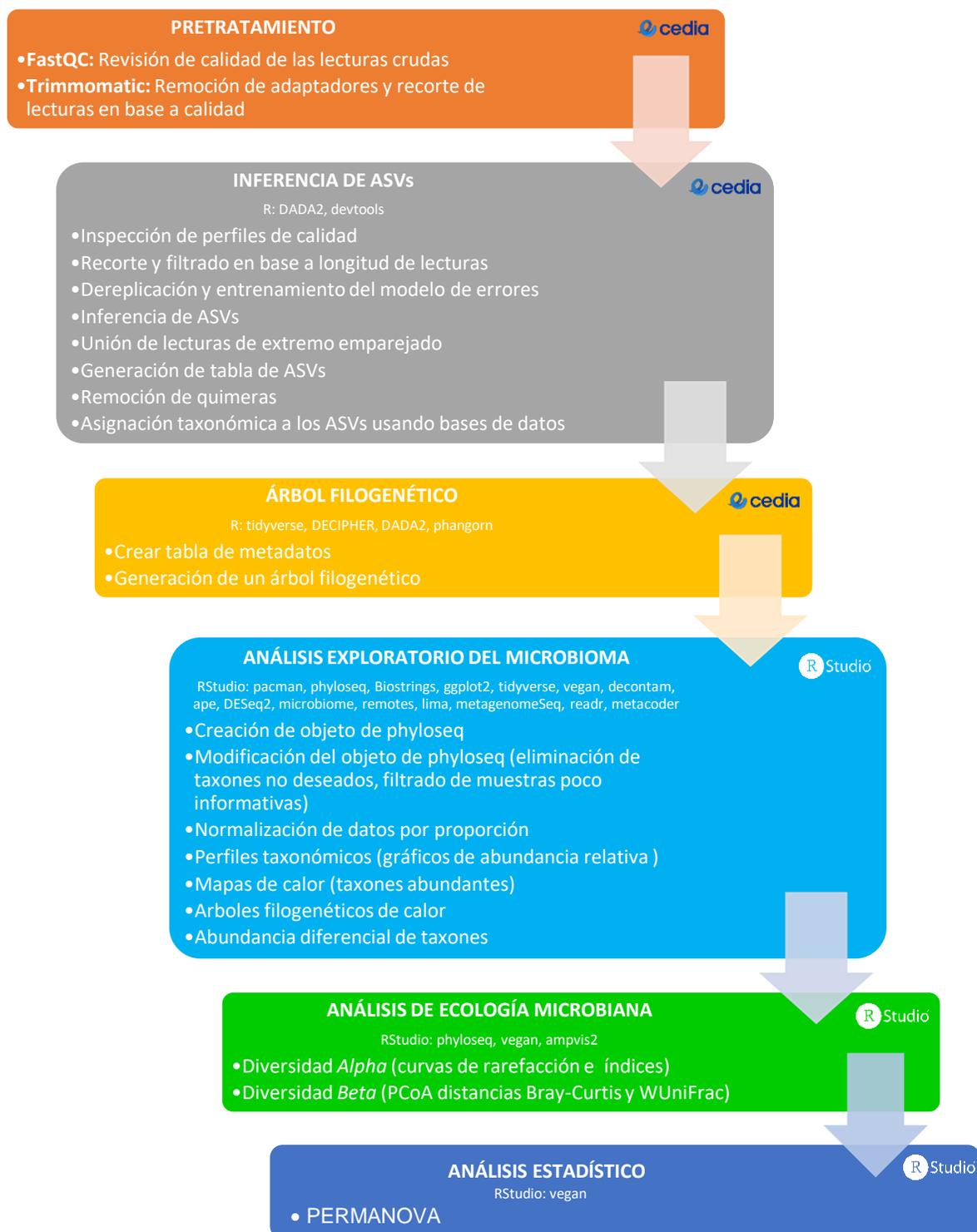
Marcador genético	Amplicón (pb)	Primer	Secuencia
16S (V3-V4)	~460	341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
		805R	5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'
ITS2	~369	ITS86F	5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3'
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Pipeline bioinformático

Las lecturas de extremo emparejado (2 × 300 pb) de secuenciación por amplicones de Illumina se procesaron utilizando el pipeline bioinformático propuesto por Callahan y colaboradores (2017) y modificado por Benitez, Malacrino & Poelstra (2021), ver detalle en Figura 7. Para el desarrollo del *pipeline* bioinformático se utilizó el *cluster* de alto rendimiento (*High performance Computing*, HPC) de CEDIA y R/RSudio.

Figura 7

Descripción del pipeline empleado en el presente trabajo de titulación



El flujo de trabajo se basó en paquetes del proyecto Bioconductor, el cual es de código abierto y maneja el entorno y lenguaje de programación R (Callahan et al., 2019), los paquetes del proyecto Bioconductor fueron instalados a través de BiocManager.

Pre tratamiento de secuencias

Con el fin de evaluar la calidad inicial de las lecturas crudas se realizó una revisión en FastQC. La remoción de los adaptadores Illumina (TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10) y el recorte de las lecturas cortas y/o de mala calidad (SLIDINGWINDOW:5:20 LEADING:5 TRAILING:5 MINLEN:50) se realizó usando Trimmomatic (v0.39).

Inferencia de ASVs

Empleando la librería de R DADA2, *pipeline* 1.16 para 16S V3-V4 (benjjneb.github.io/dada2/tutorial) y *pipeline* 1.8 para ITS2 (benjjneb.github.io/dada2/ITS_workflow), se realizó la inferencia de ASVs y la asignación taxonómica. Por lo cual, se efectuó el filtrado (con parámetros maxN=0, maxEE=c(2,2), truncQ=2) y recorte de ASVs en base a perfiles de calidad, restringiéndolos a fragmentos de 280 pb en la secuencia *forward* y 250 pb en la secuencia *reverse* para 16S V3-V4 y sin restricción de longitud para ITS2 (Kuzniar et al., 2020). En el algoritmo *dada* se ejecutó la inferencia independiente para cada muestra (pool = FALSE). Por último, la asignación taxonómica a los ASVs de hongos y bacterias se realizó mediante comparación con las bases de datos SILVA y UNITE, respectivamente (Voříšková et al., 2019). Se construyó una tabla de metadatos con la descripción de cada muestra (Síntomatología, Tejido, Localidad, Número de planta), ver Anexo 1. A continuación, se estimó un árbol filogenético a partir de los ASVs generados usando el paquete de R Phangorn (Benitez et al., 2021).

Análisis exploratorio del microbioma

La taxonomía resultante y las tablas de recuento de lecturas construidas en DADA2 se convirtieron e importaron a RStudio, a manera de un objeto de Phyloseq v1.22.3, compuesto por la tabla de ASVs (*otu_table*), tabla de metadatos (*sample_data*), tabla con asignación taxonómica (*tax_table*) y árbol filogenético (*phy_tree*) (McMurdie & Holmes, 2013). Posterior a ello, se identificaron y eliminaron secuencias de taxones no deseados (cloroplastos, mitocondrias y eucariotas) y muestras poco informativas (< 800 recuentos) (Benitez et al., 2021).

Se transformó el objeto de Phyloseq usando el método de normalización por proporciones, el cual consiste en expresar en porcentajes al número total de lecturas para cada taxón individual, donde la suma de los taxones para cada muestra es el 100% (Kuźniar et al., 2020).

Se representaron los perfiles taxonómicos en gráficos de barras en función de abundancia relativa. Se realizaron mapas de calor comparativos entre muestras sintomáticas y asintomáticas empleando la librería *apvis2*.

Usando la librería *Metacoder* se realizaron 'árboles de calor' taxonómicos. Los cuales permitieron mostrar comparaciones por pares entre sintomatología y describieron cuantitativamente la abundancia asociada a los taxones. La intensidad del color es relativa a la relación \log_2 de la diferencia en las proporciones medias de las lecturas de diferentes tratamientos. Únicamente las diferencias significativas se colorean, determinadas mediante una prueba de suma de rangos de Wilcoxon seguida de una corrección de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples (Foster et al., 2017).

Los ASVs con abundancia diferencial entre tratamientos (plantas sintomáticas y asintomáticas) se identificaron utilizando la librería *DESeq2*. Se empezó convirtiendo los datos de recuento no normalizados a un objeto de *DESeq*, luego se ajustó un modelo

univariado, se agrupó los datos por tejidos y se exploraron los contrastes en base a sintomatología. Finalmente, se identificaron los taxones abundantes diferencialmente, valor $p < 0.1$ (McMurdie & Holmes, 2014).

La composición y estructura del microbioma asociado al banano Gros Michel sintomático (S) y asintomático (A) para Fusariosis se interpretó mediante un análisis exploratorio de ASVs. Las muestras se examinaron en tres subconjuntos: pseudotallo (P), rizoma (R) y rizosfera (S).

Análisis de ecología microbiana

La evaluación de las diversidades *Alpha* y *Beta* se realizó empleando los paquetes de R *vegan* y *ampvis2*. Se evaluó la riqueza taxonómica de cada muestra (diversidad *Alpha*), usando el objeto de *Phyloseq* sin normalizar, a través de curvas de rarefacción y del cálculo de índices de diversidad (*Observed*, Shannon, Simpson, *InvSimpson*) (Rausch *et al.*, 2019). La diversidad *Beta* mide las diferencias en la composición microbiana entre muestras, para lo cual, usando el objeto de *Phyloseq* normalizado, se calcularon las distancias métricas Bray-Curtis y UniFrac ponderado. Posteriormente, se realizó un análisis de coordenadas principales (Benitez *et al.*, 2021).

Análisis estadístico

La presente investigación posee robustez estadística ($n = 60$). Se realizó un PERMANOVA usando la librería *vegan::adonis2*. Para lo cual, se emplearon las matrices de distancia UniFrac ponderado, con el fin de probar la existencia de un efecto significativo de la sintomatología a nivel ecológico. Se realizaron 10000 permutaciones y la significancia entre tratamientos se evaluó mediante el valor p (Luz, 2019).

Capítulo IV: Resultados

Lecturas de secuenciación por amplicones

La evaluación de la calidad del ADN total extraído realizada empleando un NanoDrop™ 2000 (cantidad [ng/μL], A260/A280, A260/A230), reveló que ambiente con mayor concentración y pureza promedio fue el suelo de la rizosfera (889.8, 1.8, 0.8), seguido del rizoma (474.2, 1.7, 0.7) y del pseudotallo (289.9, 1.8, 0.6).

Empleando secuenciación de alto rendimiento por amplicones de Illumina (extremo emparejado 2 × 300 pb) y como marcadores genéticos de ARN ribosómico, la subunidad 16S V3-V4 para bacterias e ITS2 para hongos, se obtuvieron con éxito (posterior al pre tratamiento) un total de 5,411,075 y 4,568,255 lecturas, respectivamente.

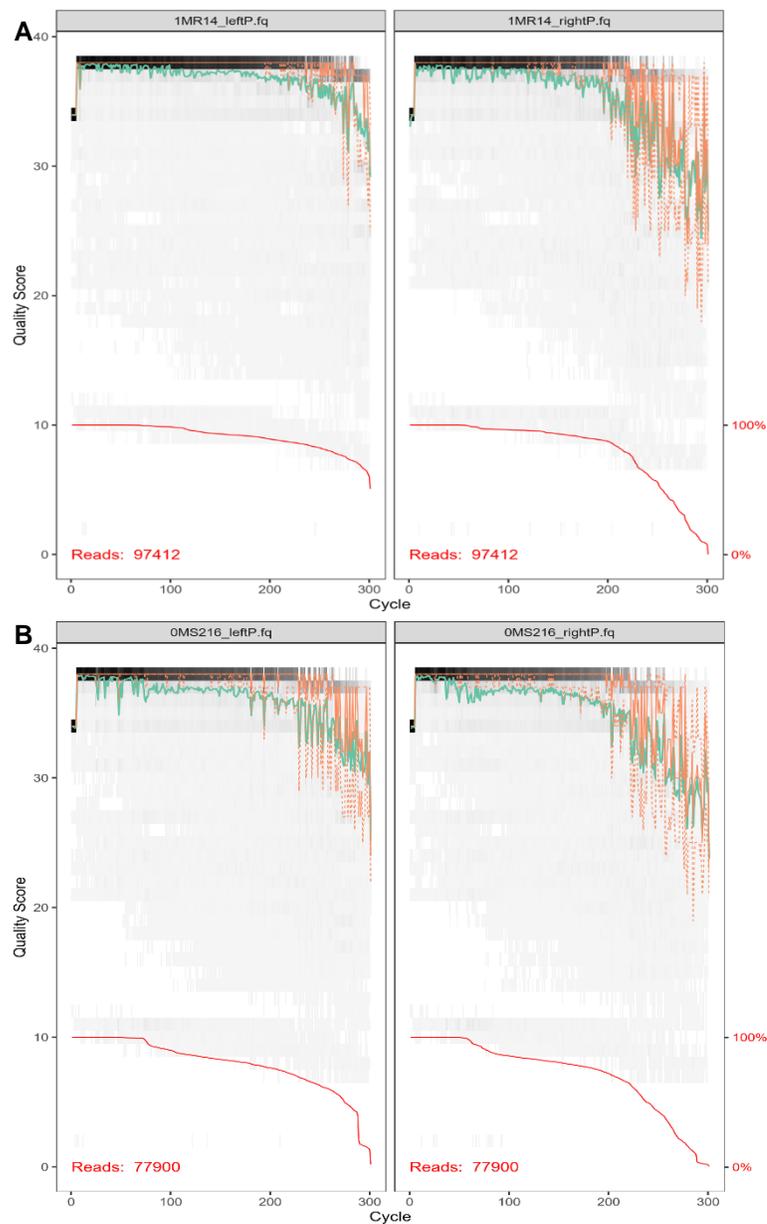
Las lecturas bacterianas revelaron una notable disminución de la calidad (Figura 8A) desde los 280 pb para las secuencias *forward* y 220 pb para las secuencias *reverse*. En el caso de las lecturas fúngicas el deterioro de la calidad se apreció desde los 220 pb para la secuencia *forward* y 200 pb para la secuencia *reverse* (Figura 8B).

Tras la ejecución de DADA2 (considerando inferencia independiente para cada muestra) se obtuvieron 1,239,227 ASVs bacterianos y 3,913,011 ASVs fúngicos, los cuales fueron asignados taxonómicamente usando las bases de datos SILVA y UNITE, respectivamente (Tabla 5).

Tras la eliminación de taxones eucariotas no deseados, filtrado de muestras poco informativas (< 800 recuentos) y eliminación de *outliers* se obtuvieron 693,720 ASVs bacterianos y 3,733,527 ASVs fúngicos, ver Anexo 2. Revelando que el 44% de los taxones bacterianos encontrados realmente eran eucariotas, cloroplastos y mitocondrias.

Figura 8

Perfiles de calidad de secuencias representativas para (A) Bacterias y (B) Hongos



Nota. A la izquierda se muestran los resultados de la secuencia *forward* y a la derecha de la secuencia *reverse*. Línea verde muestra la puntuación de calidad media para cada posición y la línea anaranjada los cuartiles de la distribución de la puntuación de calidad.

Tabla 5

Resumen del procesamiento de lecturas posterior a la inferencia de ASVs en R DADA2

Lecturas	Bacterias (16S V3-V4)		Hongos (ITS2)	
	Total	% Restante	Total	% Restante
De entrada	5411075	100	4568255	100
Filtradas y recortadas	2247019	41.53	4565376	99.94
Forward dereplicadas	2100113	38.81	4518963	98.92
Reverse dereplicadas	2115032	39.09	4522537	99
Secuencias combinadas	1840654	34.02	4106577	89.89
Sin quimeras	1239227	22.9	3913011	85.66

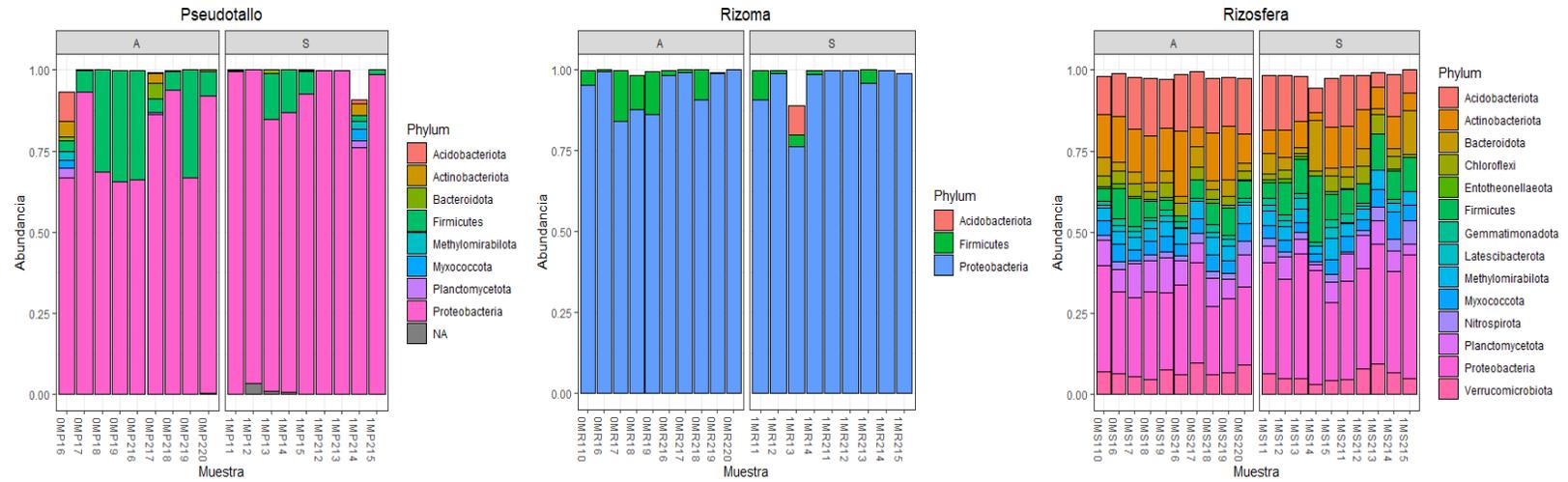
Análisis exploratorio bacteriano

Los perfiles taxonómicos a nivel de filo evidenciaron una clara diferenciación entre la composición taxonómica de las muestras de tejido vegetal (pseudotallo y rizoma) y del suelo de la rizosfera, siendo el principal filo *Proteobacteria*, seguido de *Acidobacteriota* y *Firmicutes*, ver Figura 9.

A nivel de género igualmente sobresalió el suelo de la rizosfera como el entorno más diverso, los géneros bacterianos más abundantes fueron *Pectobacterium*, *Klebsiella* y *Nitrospira* en pseudotallo, rizoma y rizosfera, respectivamente (Figura 10).

Figura 9

Asignación taxonómica bacteriana (filo) en función de abundancia relativa y agrupación en base a sintomatología



Nota. A=Asintomático, S=Sintomático. NA= AVSs sin asignación taxonómica. No se muestran los taxones con abundancia relativa < 0.1%.

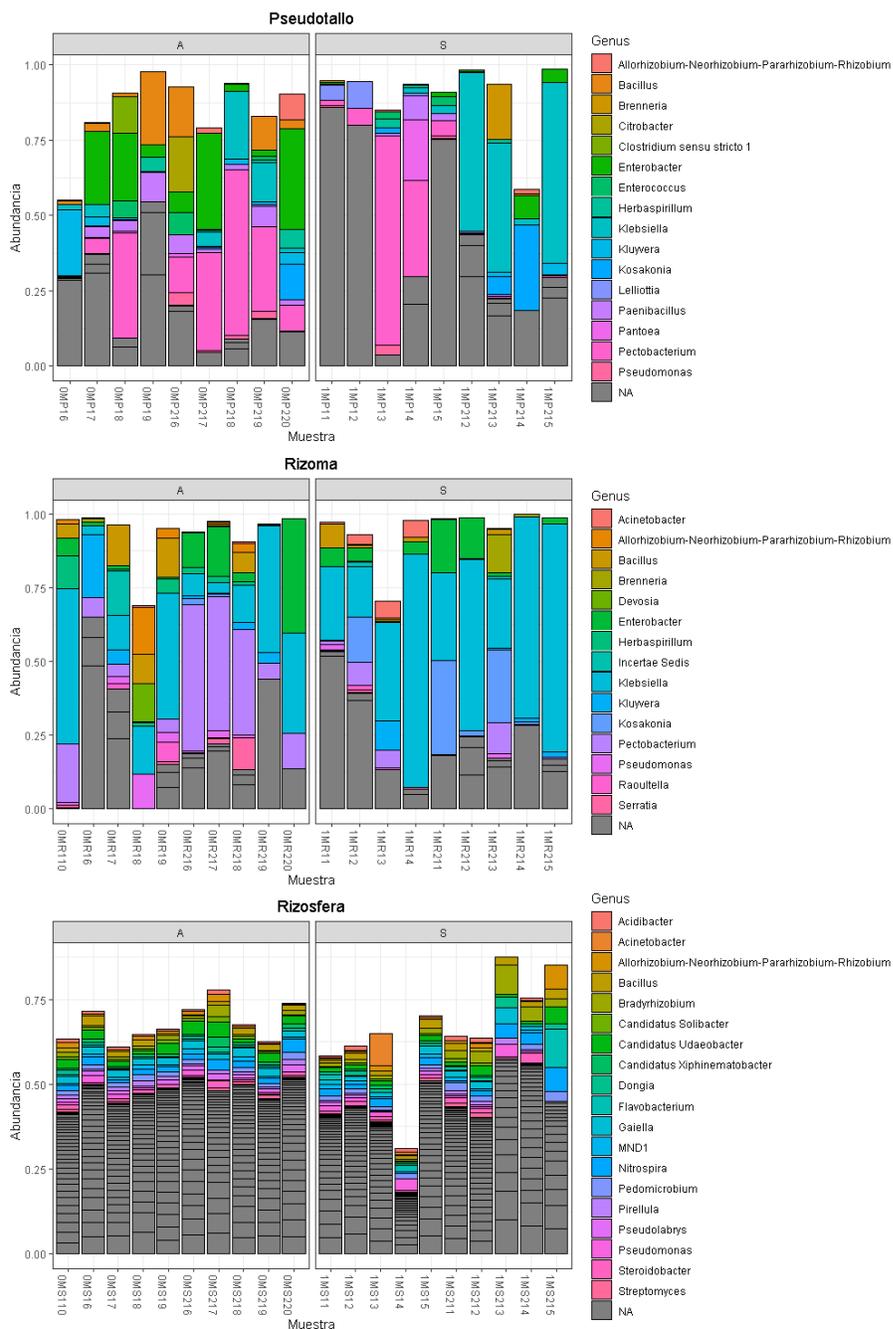
Los principales géneros bacterianos encontrados en pseudotallo asintomático son *Pectobacterium*, *Enterobacter* y *Bacillus*. Por otro lado, en pseudotallo sintomático se encontraron mayormente *Klebsiella*, *Pectobacterium* y *Kosakonia*. De igual manera, en el rizoma asintomático se encontró *Klebsiella*, *Pectobacterium* y *Enterobacter*, y en el caso de rizoma sintomático se encontraron mayormente *Klebsiella* y *Kosakonia* (Figura 10). Los géneros bacterianos representados en la Figura 10 (> 99.9 %) muestran que el suelo es por mucho el ambiente más diverso con abundancias relativas similares entre géneros, con gran parte de los géneros presentes en el suelo de la rizosfera se encuentran en abundancia relativa < 0.5 %. Asimismo, se pudo observar un elevado porcentaje de AVSs sin asignación taxonómica (NA).

Los resultados de los mapas de calor (Figura 11) revelaron que en muestras asintomáticas el género dominante en pseudotallo fue *Pectobacterium* (19.6%), seguido de *Enterobacter* (14.1%), *Bacillus* (6.7%) y *Paenibacillus* (3.9%) (Figura 11II). De manera similar, los géneros bacterianos más abundantes en rizoma de plantas asintomáticas fueron *Klebsiella* (22.6 %), *Pectobacterium* (18.4%), *Enterobacter* (8%) y *Bacillus* (5%) (Figura 11III). Se observó una mayor abundancia de los géneros *Klebsiella* (P=18.1% y R=45.6%) y *Kosakonia* (P=4% y R=8.3%) en muestras de tejido vegetal sintomáticas, considerándose como posibles géneros predisponentes a Fusariosis.

De igual manera los géneros *Kluyvera* (P=3.6%, R=3.3%), *Pseudomonas* (P=1%, R=2.3%) y *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (P=1.2%, R=2.4%) se encontraron en mayor proporción en muestras asintomáticas de tejido vegetal (Figura 11I).

Figura 10

Asignación de taxonómica bacteriana (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a sintomatología



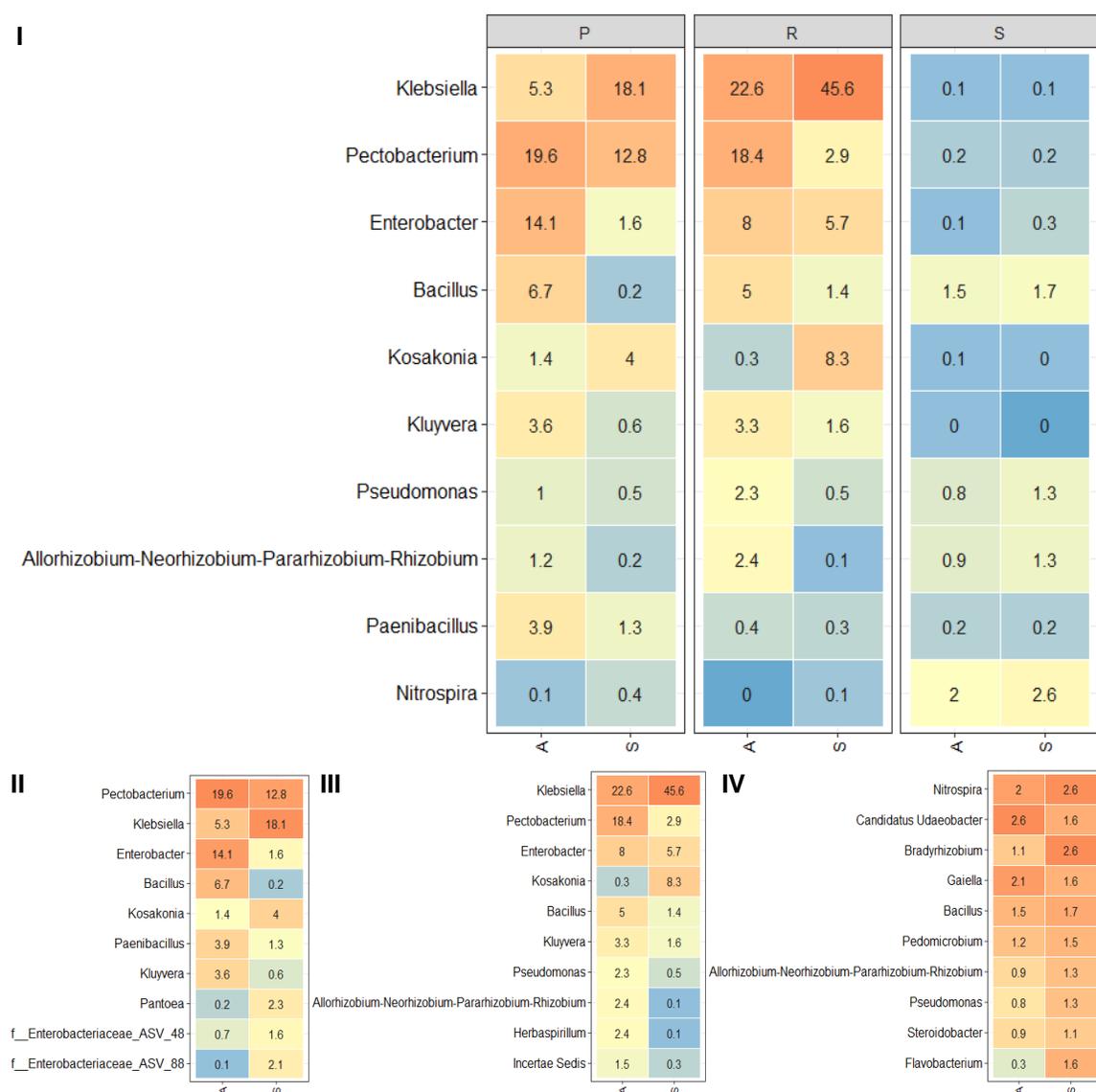
Nota. A=Asintomático, S=Sintomático. NA= AVSs sin asignación taxonómica. No se muestran los taxones con abundancia relativa < 0.1%.

Los géneros abundantes en la rizosfera asintomática fueron *Ca. Udaeobacter* (2.6%) y *Gaiella* (2.1%). Por otro lado, los predominantes en la rizosfera sintomática fueron *Nitrospira* (2.6%) y *Bradyrhizobium* (2.6%), ver Figura 11IV.

Figura 11

Mapas de calor de géneros bacterianos. (I) General en función de tejidos, (II)

Pseudotallo, (III) Rizoma y (IV) Rizosfera



Nota. A=Asintomático, S=Sintomático.

Los “árboles de calor” realizados permitieron obtener una visualización filogenética de los taxones significativamente diferenciales con base en la sintomatología. Además, proporcionaron una vista integrada de cómo todos los niveles taxonómicos varían. Estas observaciones además de ser consistentes con los resultados descritos previamente, permitieron la identificación de nuevos taxones diferenciales (Figuras 12, 13 y 14). Los taxones relacionados con muestras asintomáticas se muestran en color verde y los taxones relacionados con muestras sintomáticas en color anaranjado. Los gráficos en formato .pdf en alta resolución se encuentran en la sección de Anexos (Anexo 3, 4 y 5).

Por ejemplo, el árbol de calor bacteriano realizado para pseudotallo (Figura 12) mostró, que *Pectobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Pseudomonas* y *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* están presentes diferencialmente con mayor abundancia en muestras asintomáticas (verde), en comparación con las muestras sintomáticas en las que *Acinetobacter*, *Moraxellaceae* y el grupo *Verrucomicrobiota* son diferencialmente más abundantes (anaranjado).

Figura 12

Árbol de calor bacteriano: *Pseudotallo*

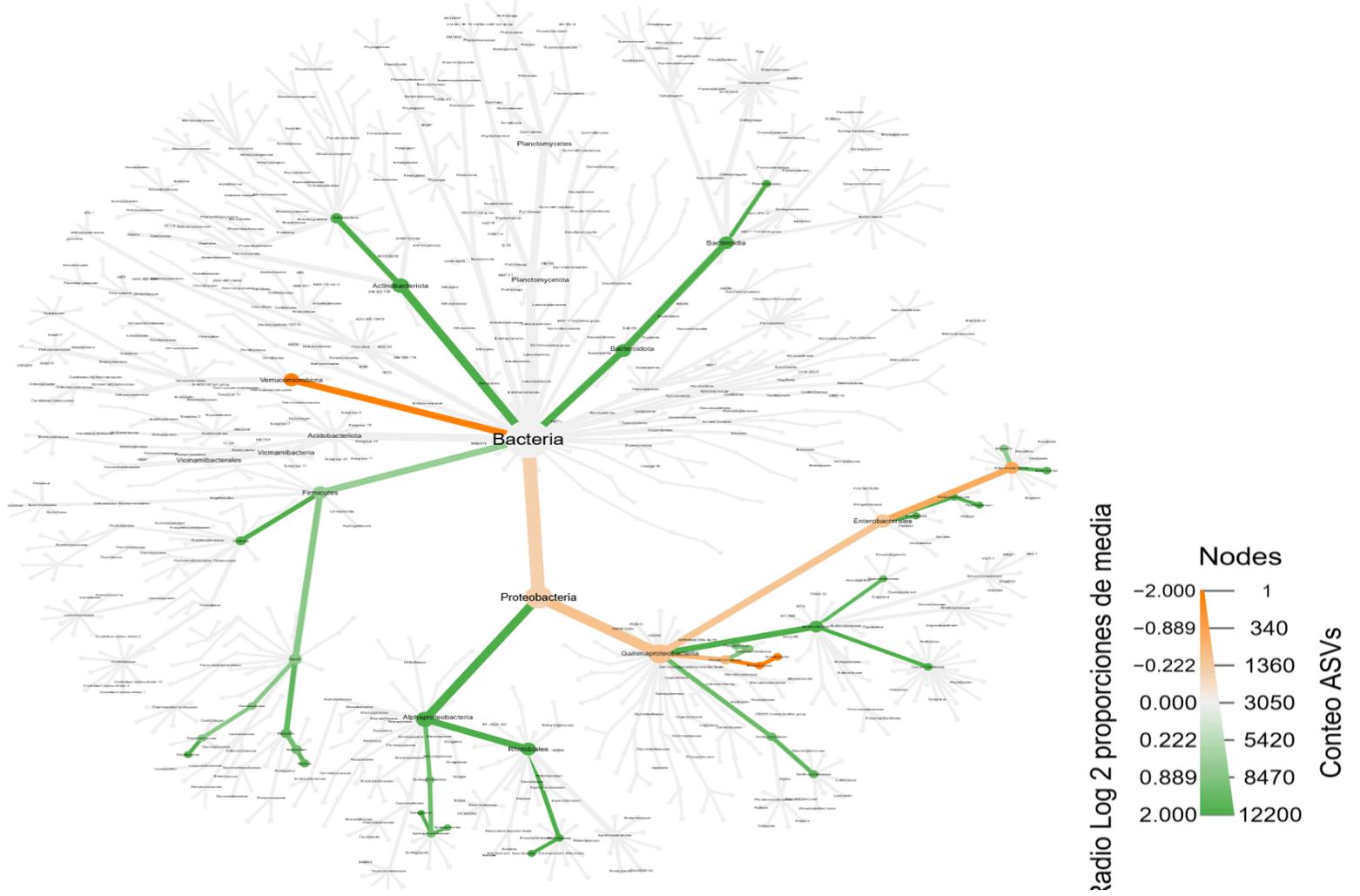


Figura 13

Árbol de calor bacteriano: Rizoma

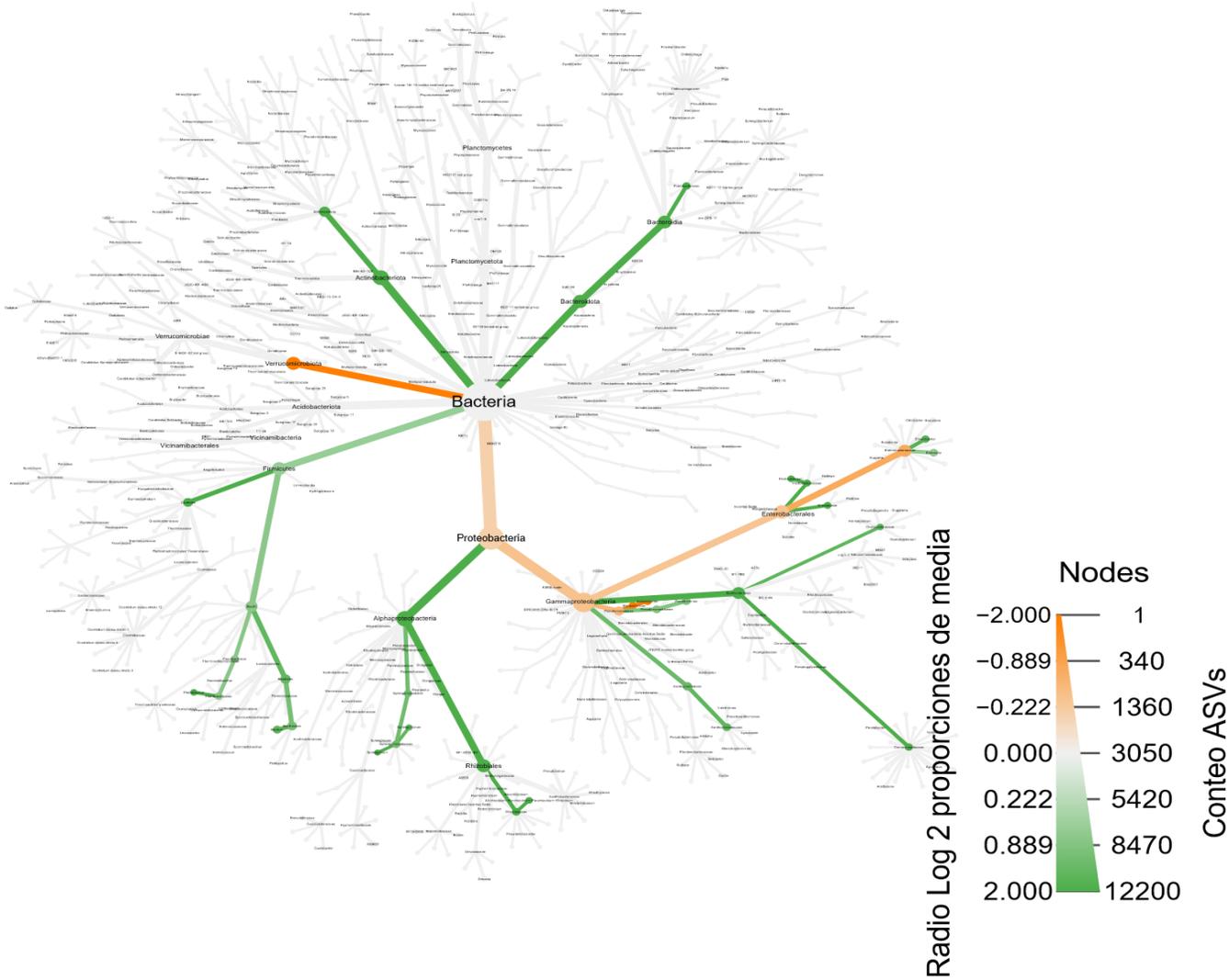
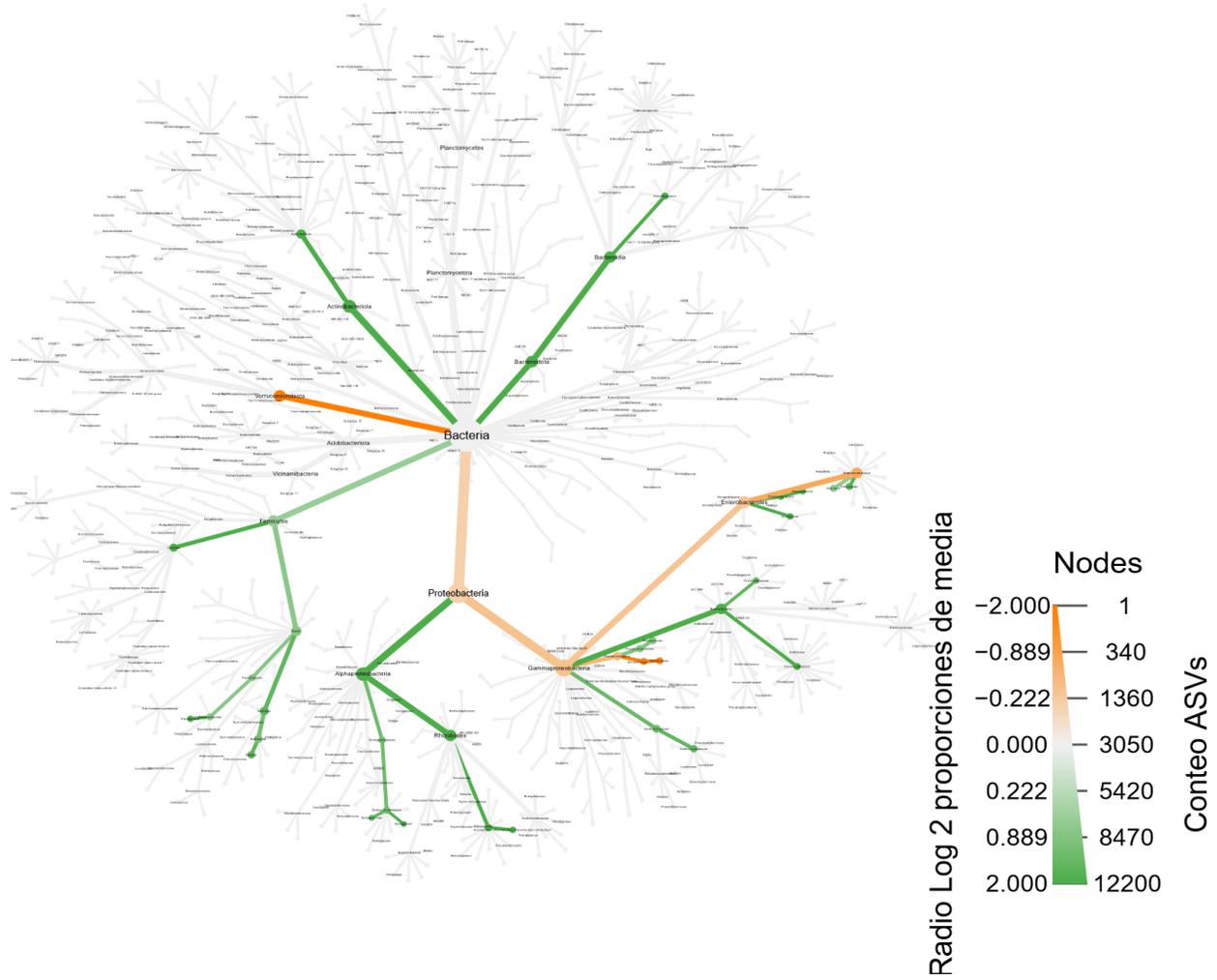


Figura 14

Árbol de calor bacteriano: Rizosfera

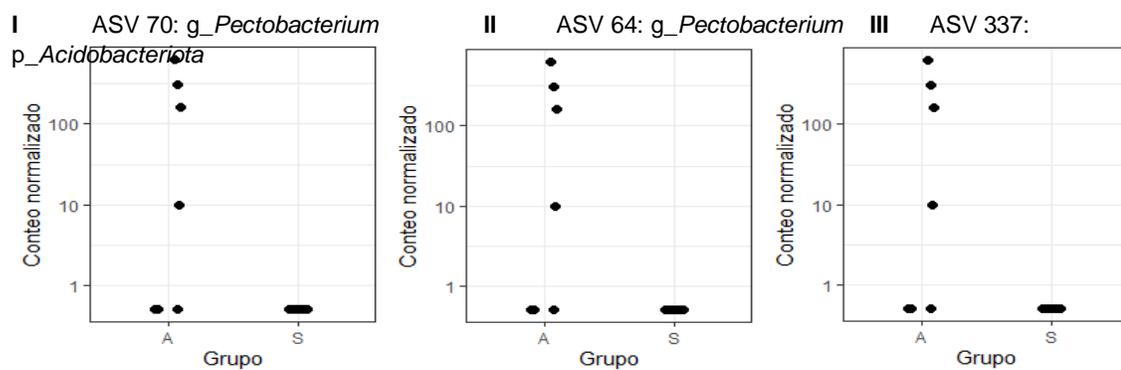


Se identificaron los ASVs con abundancia diferencial (valor $p < 0.1$) presentes en cada entorno usando la librería DESeq2. La Figura 15 detalla los ASVs bacterianos con abundancia diferencial más significativa. Los ASVs bacterianos presentes con abundancia diferencial se encontraron únicamente en muestras asintomáticas, 13 ASVs (1.9%) en pseudotallo, 24 ASVs (3.3%) en rizoma y 4 ASVs (0.09%) en rizosfera. Siendo los géneros presentes mayormente *Pectobacterium*, *Enterobacter* y *Herbaspirillum* (Tabla 6).

Por otro lado, la base de datos usada para la asignación taxonómica bacteriana (SILVA), logró la identificación de ASVs únicamente a nivel de género. Por lo cual se recurrió a BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) aceptando asignaciones taxonómicas a nivel de especie con *Query Coverage* > 98% y porcentaje de identidad > 95 (Tabla 6) (Callahan, Wong, et al., 2019). Los ASVs 200, 218, 233, 236 y 292 correspondieron a *Pectobacterium* (no clasificado) identificado como endosimbionte de *Cicadella viridis* (número de accesoión KJ660086.1).

Figura 15

ASVs bacterianos con abundancia diferencial máxima en (I) Pseudotallo, (II) Rizoma y (III) Rizosfera



Nota. Escala log₁₀. A=Asintomático, S=Sintomático.

Tabla 6

ASVs bacterianos con abundancia diferencial en muestras asintomáticas

Tejido	No. ASV	Asignación taxonómica (SILVA)	BLAST	
			Especie	Número de accesión
Pseudotallo	70	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	78	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	86	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	136	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	146	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	126	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	130	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	184	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	122	<i>Enterobacter</i>	<i>hormaechei</i>	MT640267.1
	106	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	MT613381.1
	90	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	MT613381.1
	116	<i>Enterobacter</i>	<i>hormaechei</i>	CP044335.1
	64	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
Rizoma	126	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	78	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	86	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	109	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	102	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	130	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1

Tejido	No. ASV	Asignación taxonómica (SILVA)	BLAST	
			Especie	Número de accesión
Rizoma	136	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	146	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	184	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	195	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	230	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	226	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	262	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	314	<i>Herbaspirillum</i>	<i>aquaticum</i>	KM272790.1
	200	<i>Pectobacterium</i>	NC	KJ660086.1
	218	<i>Pectobacterium</i>	NC	KJ660086.1
	233	<i>Pectobacterium</i>	NC	KJ660086.1
	236	<i>Pectobacterium</i>	NC	KJ660086.1
	280	<i>Herbaspirillum</i>	<i>aquaticum</i>	KM272790.1
	128	<i>Pectobacterium</i>	sp.	KY124187.1
	292	<i>Pectobacterium</i>	NC	KJ660086.1
	219	<i>Herbaspirillum</i>	<i>aquaticum</i>	KM272790.1
278	<i>Herbaspirillum</i>	<i>aquaticum</i>	KM272790.1	
Rizosfera	337	<i>p_Acidobacteriota</i>	NI	-
	399	<i>c_Blastocatellia</i>	NI	-
	377	<i>f_Entotheonellaceae</i>	NI	-
	529	<i>c_Dehalococcoidia</i>	NI	-

Nota. Análisis realizado con valor $p < 0.1$. NI: No identificada. NC: No clasificado.

Análisis exploratorio fúngico

Los perfiles taxonómicos fúngicos no evidenciaron diferencias en su composición siendo *Ascomycota* y *Basidiomycota* lo filos dominantes en todos los tejidos, ver Figura 16.

Figura 16

Asignación taxonómica fúngica (filo) en función de abundancia relativa y agrupación en base a tejido



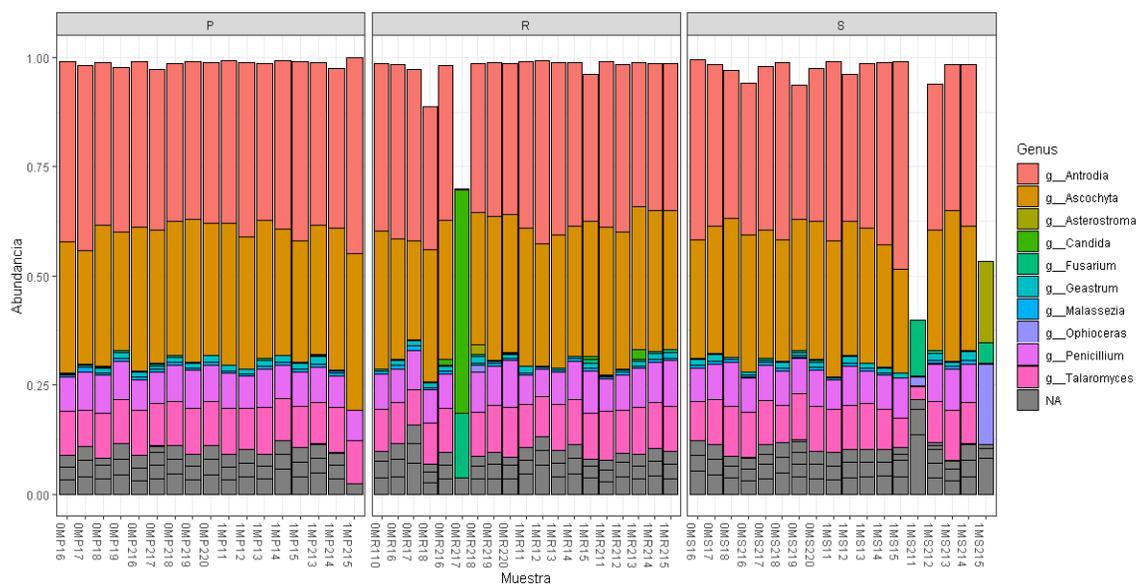
Nota. P=Pseudotallo, R=Rizoma y S=Rizosfera. NA= AVSs sin asignación taxonómica.

No se muestran los taxones con abundancia relativa < 0.05%.

El perfil taxonómico en función de abundancia relativa (Figura 17) permitió identificar tres muestras con datos atípicos o *outliers* (OMR217, 1MS211 y 1MS215) los cuales pudieron afectar severamente el análisis de datos posterior (Dai et al., 2020). Por lo que dichas muestras fueron removidas y no se consideraron en los subsiguientes análisis.

Figura 17

Asignación taxonómica fúngica (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a tejido



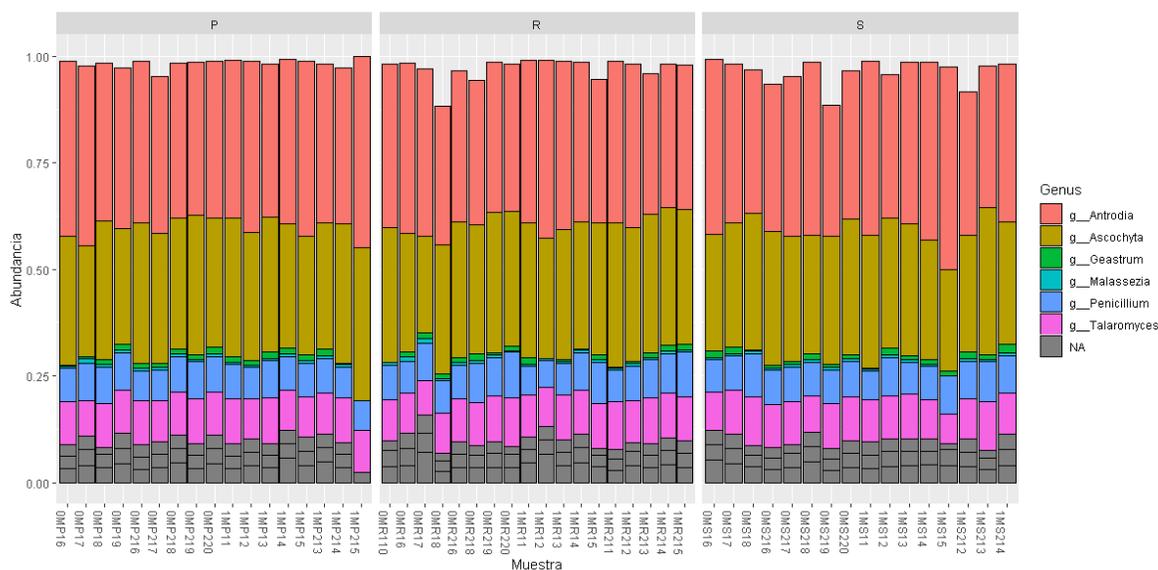
Nota. P=Pseudotallo, R=Rizoma y S=Rizosfera. NA= AVSs sin asignación taxonómica.

No se muestran los taxones con abundancia relativa < 0.3%.

Se pudo observar homogeneidad en los géneros fúngicos en todos los tejidos, siendo los más abundantes *Antrodia*, *Ascochyta*, *Talaromyces* y *Penicillium* (Figura 18).

Figura 18

Asignación taxonómica fúngica (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a tejido sin outliers



Nota. P=Pseudotallo, R=Rizoma y S=Rizosfera. NA= AVSs sin asignación taxonómica.

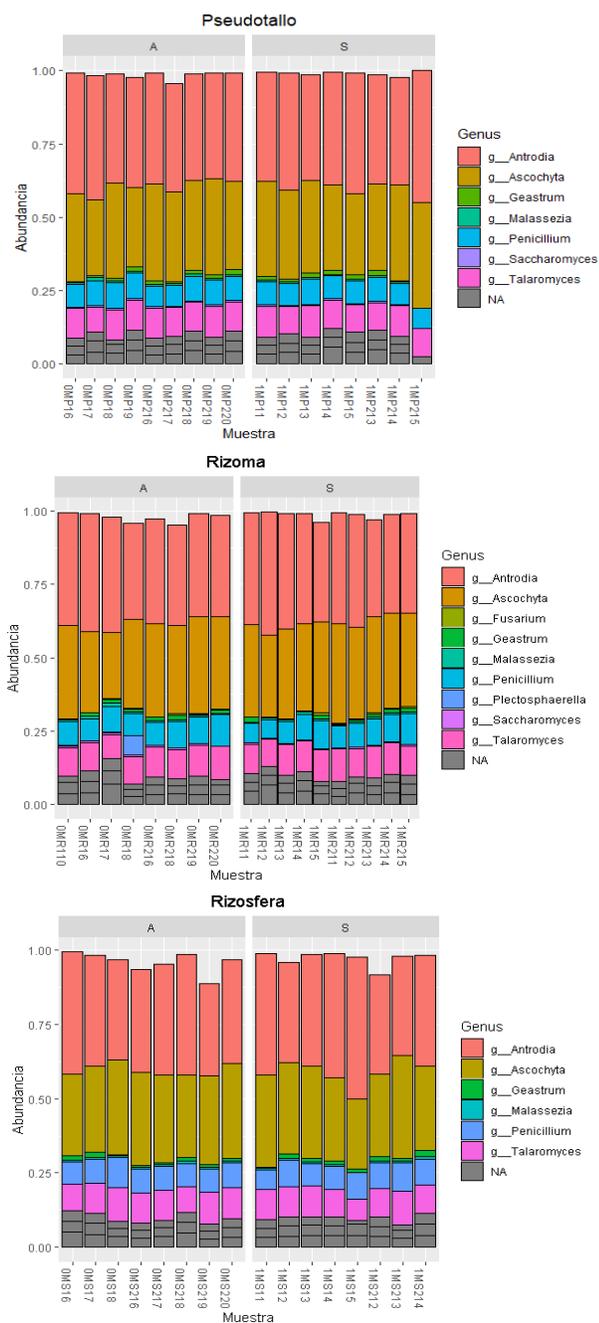
No se muestran los taxones con abundancia relativa < 0.3%.

Se observó que el rizoma es el tejido con mayor número de géneros identificados (abundancia > 99.95%), entre los cuales se encontró *Fusarium* (Figura 19).

El mapa de calor (Figura 20) reveló los mismos géneros dominantes en todos los entornos, *Antrodia* (36.2% - 38.9%), *Ascochyta* (29.4% - 31.3%), *Talaromyces* (9.6% - 10.3%) y *Penicillium* (7.7% - 8.6%). Además, a simple vista no se observan diferencias representativas entre los géneros presentes en muestras asintomáticas y sintomáticas. Los ASVs 5, 6, 10, 8 y 11 se hallaron entre los principales, sin embargo no se logró la asignación taxonómica a nivel de género. Por otro lado, no se encontró al género *Fusarium* figurando en los mapas de calor para cada tejido (Figura 20).

Figura 19

Asignación de taxonómica fúngica (género) en función de abundancia relativa y agrupación en base a sintomatología

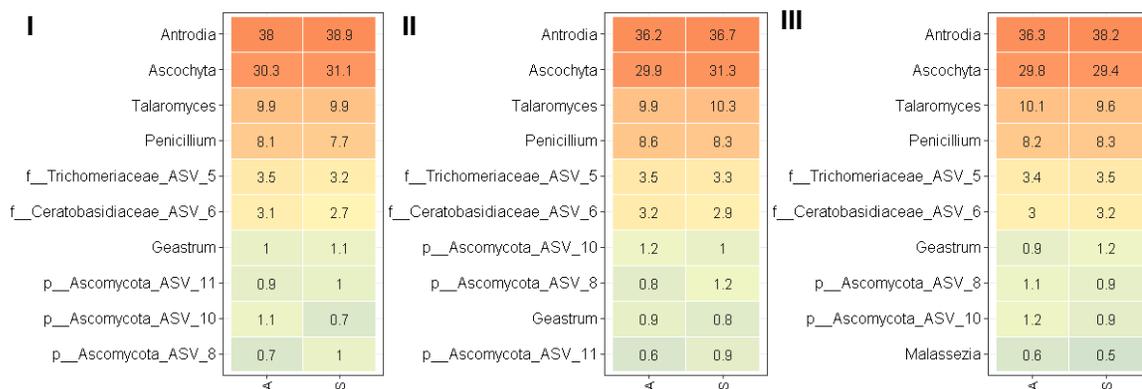


Nota. A=Asintomático, S=Sintomático. NA= AVSs sin asignación taxonómica. No se muestran los taxones con abundancia relativa < 0.05%.

Figura 20

Mapas de calor de géneros fúngico abundantes en (I) Pseudotallo, (II) Rizoma y (III)

Rizosfera



Nota. A=Asintomático, S=Sintomático.

Las visualizaciones de árboles de calor fúngicos (Figura 21, 22 y 23) permitieron la identificación de taxones diferenciales previamente no identificados. Los gráficos en formato .pdf en alta resolución se encuentran en la sección de Anexos (Anexo 6, 7 y 8).

El árbol de calor fúngico realizado para pseudotallo (Figura 21) reveló, a los géneros *Purpureocillium*, *Vishniacozyma*, *Mortierella* y a la familia *Psathyrellaceae* presentes diferencialmente en muestras asintomáticas (verde). Por otro lado, en las muestras sintomáticas los géneros *Lasiodiplodia*, *Apiotrichum*, *Cryptococcus*, y *Fusarium* (anaranjado) fueron significativamente más abundantes. En el rizoma (Figura 22) se observó un protagonismo similar al del pseudotallo, encontrándose todos los géneros mencionados y adicionalmente en el caso de muestras asintomáticas a *Candida* y *Geastrum*. Por último en la rizosfera (Figura 23) se revelaron los mismos taxones mencionados previamente.

Figura 21

Árbol de calor fúngico: *Pseudotallo*

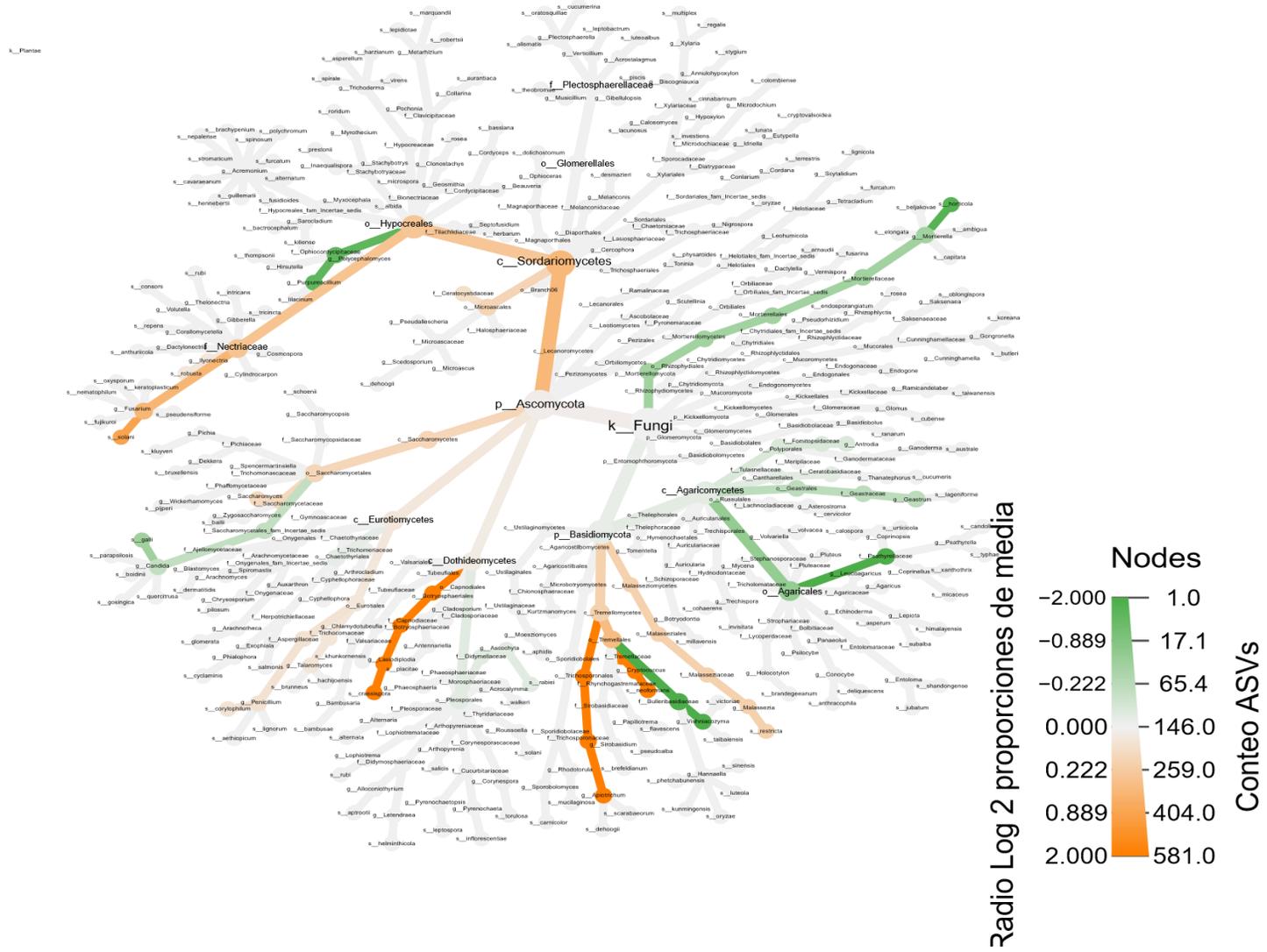
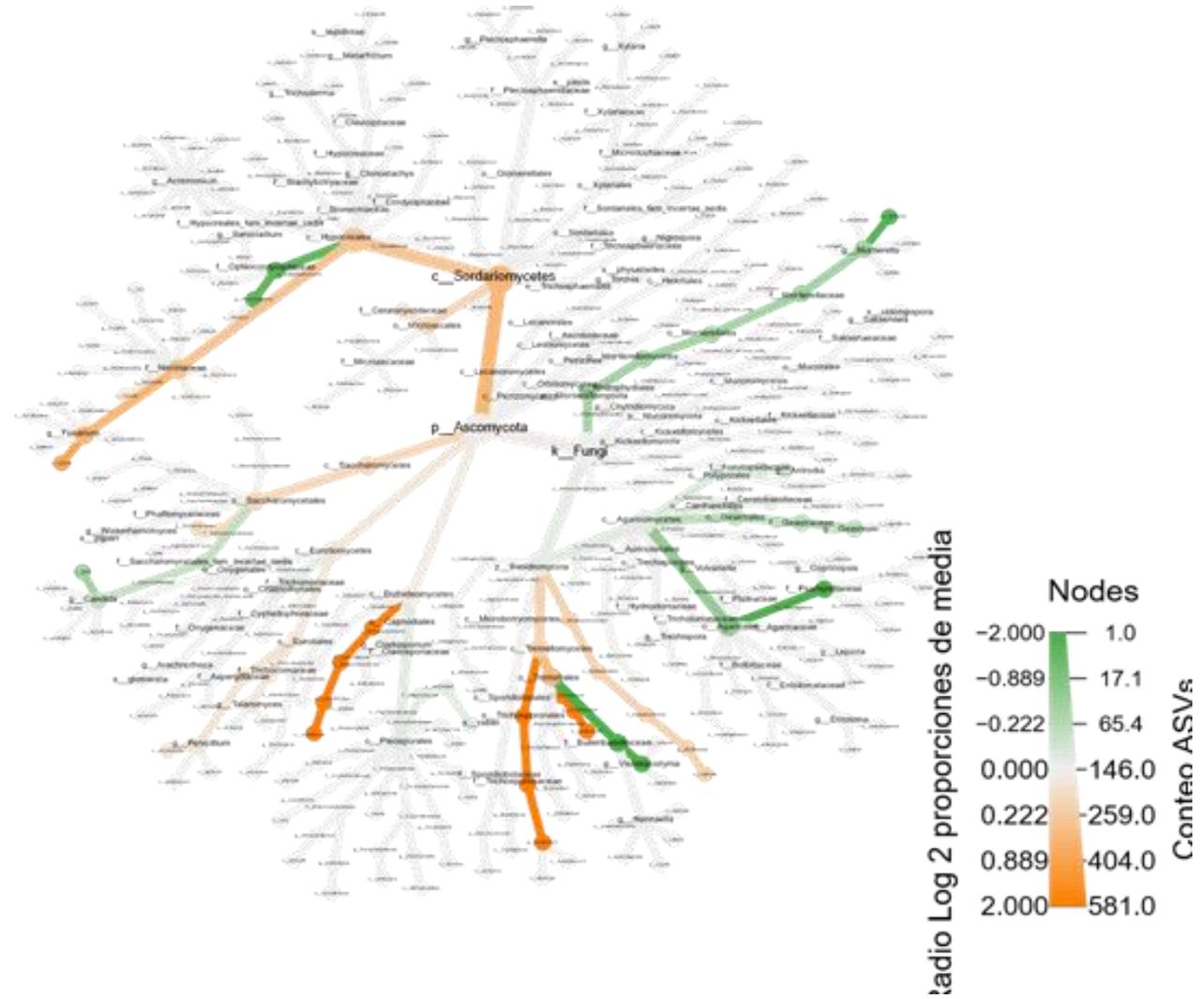


Figura 22

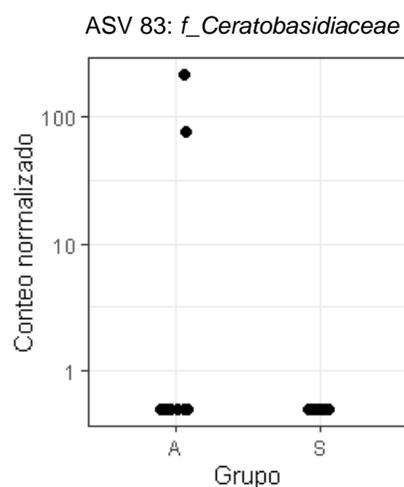
Árbol de calor fúngico: Rizoma



Seguidamente, el análisis de abundancia diferencial (valor $p < 0.1$) reveló ASVs con mayor presencia tanto en muestras sintomáticas como asintomáticas. El ASV 83, correspondiente a la familia *Ceratobasidiaceae* (número de accesoión MG682255.1), estuvo presente en muestras asintomáticas de rizosfera con abundancia diferencial máxima (Figura 24), sin embargo no se logró su identificación a nivel de género.

Figura 24

ASV fúngico con abundancia diferencial máxima en muestras asintomáticas de rizosfera



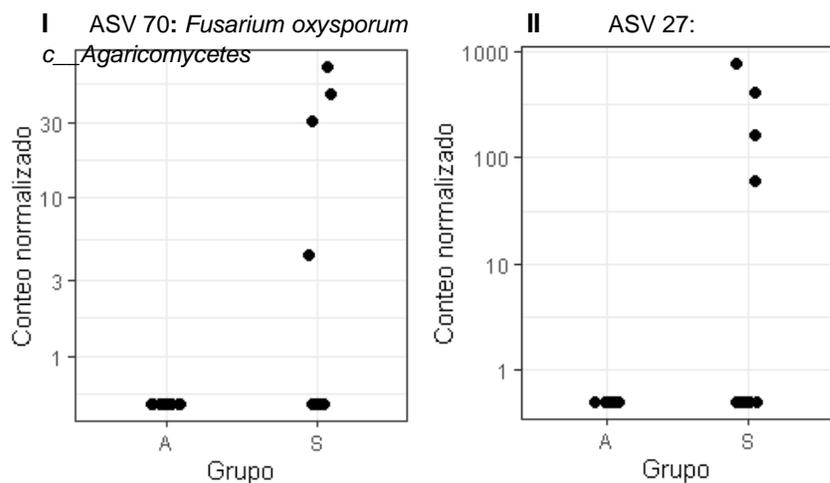
Nota. Escala \log_{10} . A=Asintomático, S=Sintomático.

Por otro lado, *Fusarium oxysporum* (ASV 70) se encontró de forma diferencialmente abundante en muestras de pseudotallo sintomático (Figura 25I). Además, se encontraron 2 ASVs (2%) con abundancia diferencial en muestras de rizosfera sintomáticas, ver Tabla 7. No se encontraron ASVs fúngicos con abundancia diferencial en muestras de rizoma.

Figura 25

ASVs fúngicos con abundancia diferencial máxima en muestras sintomáticas (I)

Pseudotallo y (II) *Rizosfera*



Nota. Escala \log_{10} . A=Asintomático, S=Sintomático.

De igual manera, la clase *Agaricomycetes* y el género *Rhodotorula* se encontraron significativamente abundantes en muestras sintomáticas de rizosfera, considerándose como posibles especies predisponentes a la Fusariosis (Tabla 7). A pesar de que se logró la asignación taxonómica a nivel de especie con la base de datos UNITE, los resultados se ratificaron usando BLAST®.

Tabla 7

ASVs fúngicos con abundancia diferencial en muestras sintomáticas

Tejido	No. ASV	Asignación taxonómica (UNITE)	(BLAST)	
			Especie	Número de accesión
Pseudotallo	70	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>oxysporum</i> aislado N612	MT560381.1
	27	<i>c__Agaricomycetes</i>	NI	-
Rizosfera	105	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>mucilaginosa</i> aislado UP12	MT465994.1

Nota. Análisis realizado con valor $p < 0.1$. NI: No identificada.

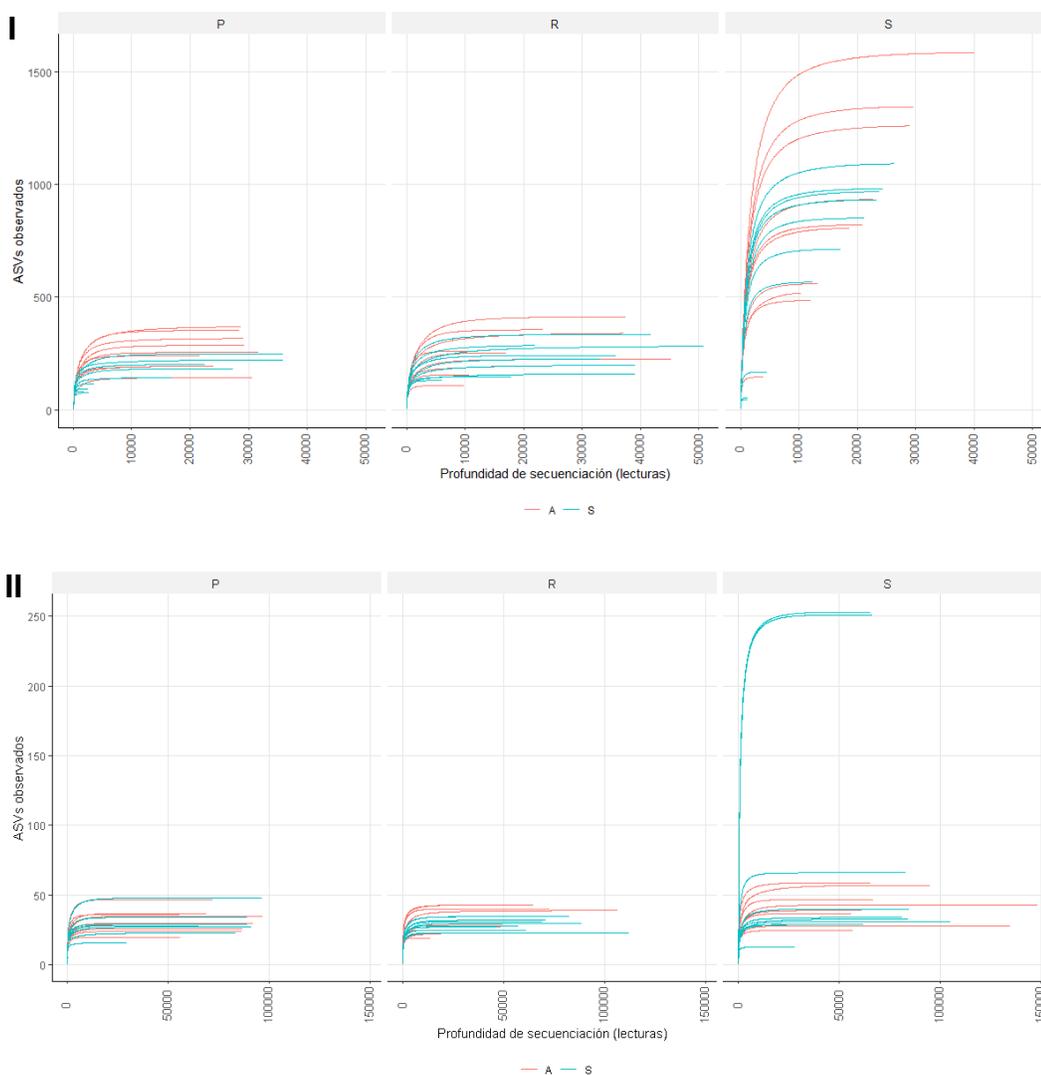
Análisis de ecología microbiana

Diversidad Alpha

La profundidad de secuenciación (número de lecturas obtenidas en una muestra) se evaluó mediante curvas de rarefacción realizadas para los conjuntos de ASVs de hongos y bacterias (Figura 26). Tanto para la comunidad bacteriana como fúngica, a medida que aumenta la profundidad de lectura para cada muestra, también lo hace la riqueza taxonómica. Se alcanzó las mesetas de saturación para todos los tejidos, indicando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir toda la diversidad de las muestras (Mbareche et al., 2020). Se observó un mayor número de ASVs en las muestras del suelo de la rizosfera.

Figura 26

Curvas de rarefacción para (I) 16S V3-V4 e (II) ITS2 en función de tejido



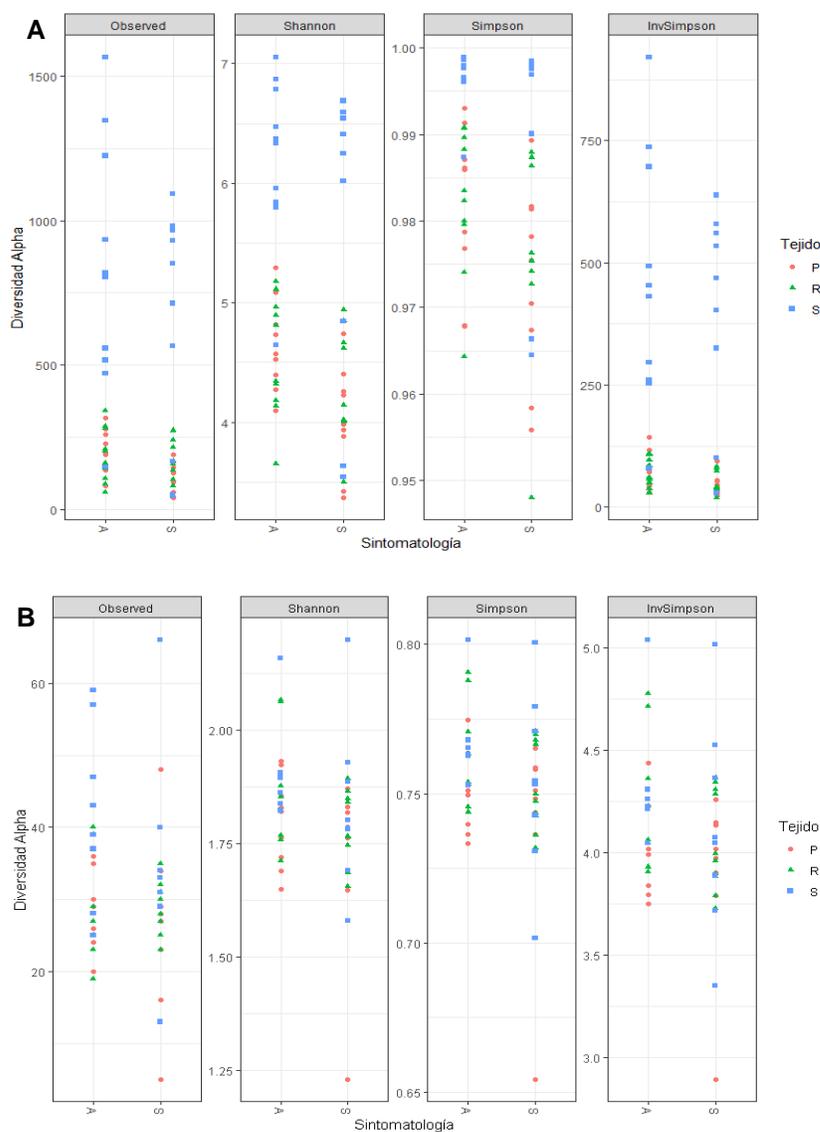
Nota. A=Asintomático, S=Sintomático.

Para explorar la distribución de las especies intrínseca de cada muestra se evaluó la riqueza taxonómica observada y los índices de diversidad Shannon, Simpson e InvSimpson (Figura 27). En la comunidad bacteriana (Figura 27A), los puntajes obtenidos por las muestras asintomáticas fueron ligeramente mayores que las muestras sintomáticas. Se observó que las muestras de rizosfera obtuvieron las mayores riquezas

taxonómicas y los mayores puntajes en todos los índices en relación a las muestras de tejido vegetal. En el caso de la comunidad fúngica tanto la riqueza taxonómica como los índices de diversidad presentaron valores similares en muestras sintomáticas y asintomáticas (Figura 27B).

Figura 27

Diversidad Alpha observada en la comunidad (A) bacteriana y (B) fúngica



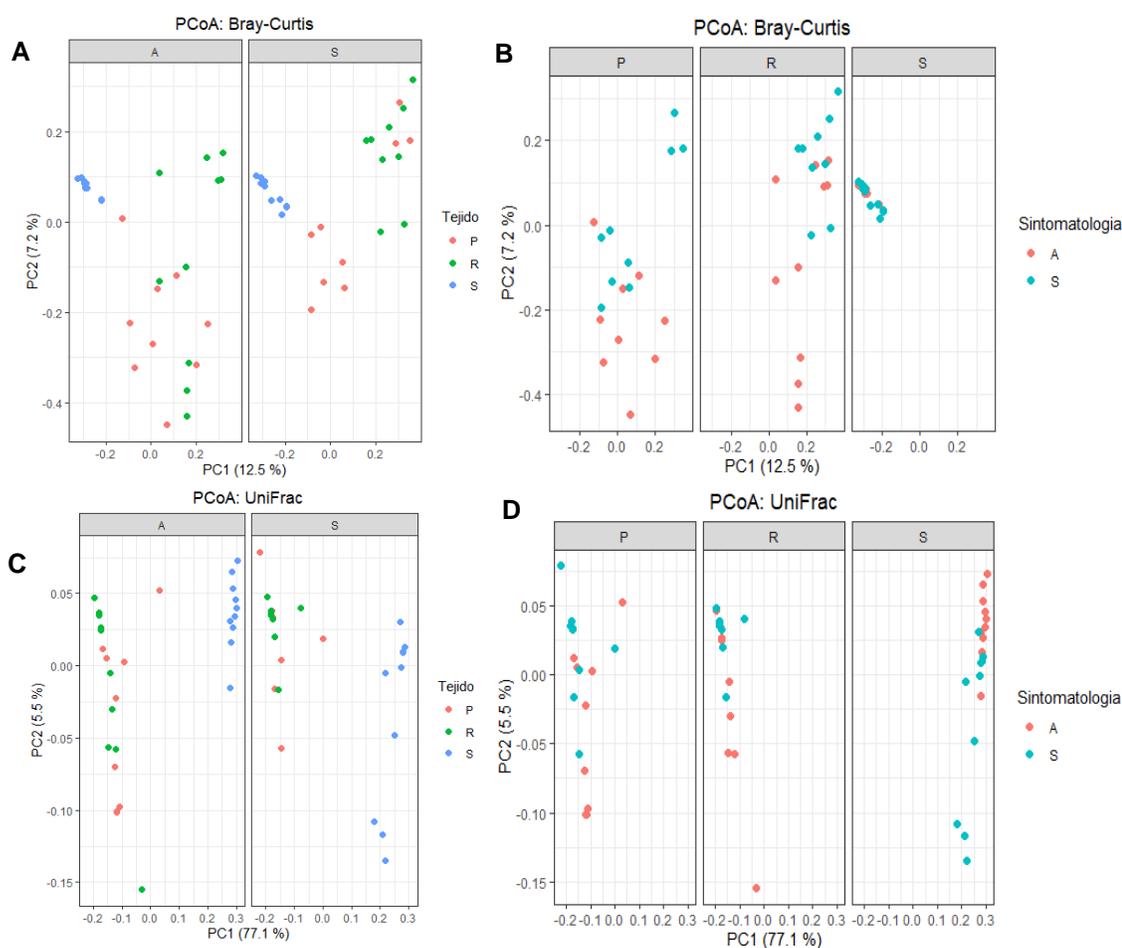
Nota. "Observed" hace referencia a la diversidad de la muestra.

Diversidad Beta

Seguidamente, se evaluaron las diferencias en la composición microbiana entre poblaciones en muestras sintomáticas y asintomáticas (diversidad Beta), mediante PCoAs empleando las distancias métricas Bray-Curtis y UniFrac ponderado. Se consideraron agrupaciones en base a tejido y sintomatología, para la comunidad bacteriana (Figura 28) y fúngica (Figura 29).

Figura 28

Diversidad Beta bacteriana: PCoA. (A) Bray-Curtis: Tejido, (B) Bray-Curtis: Sintomatología, (C) UniFrac: Tejido y (D) UniFrac: Sintomatología

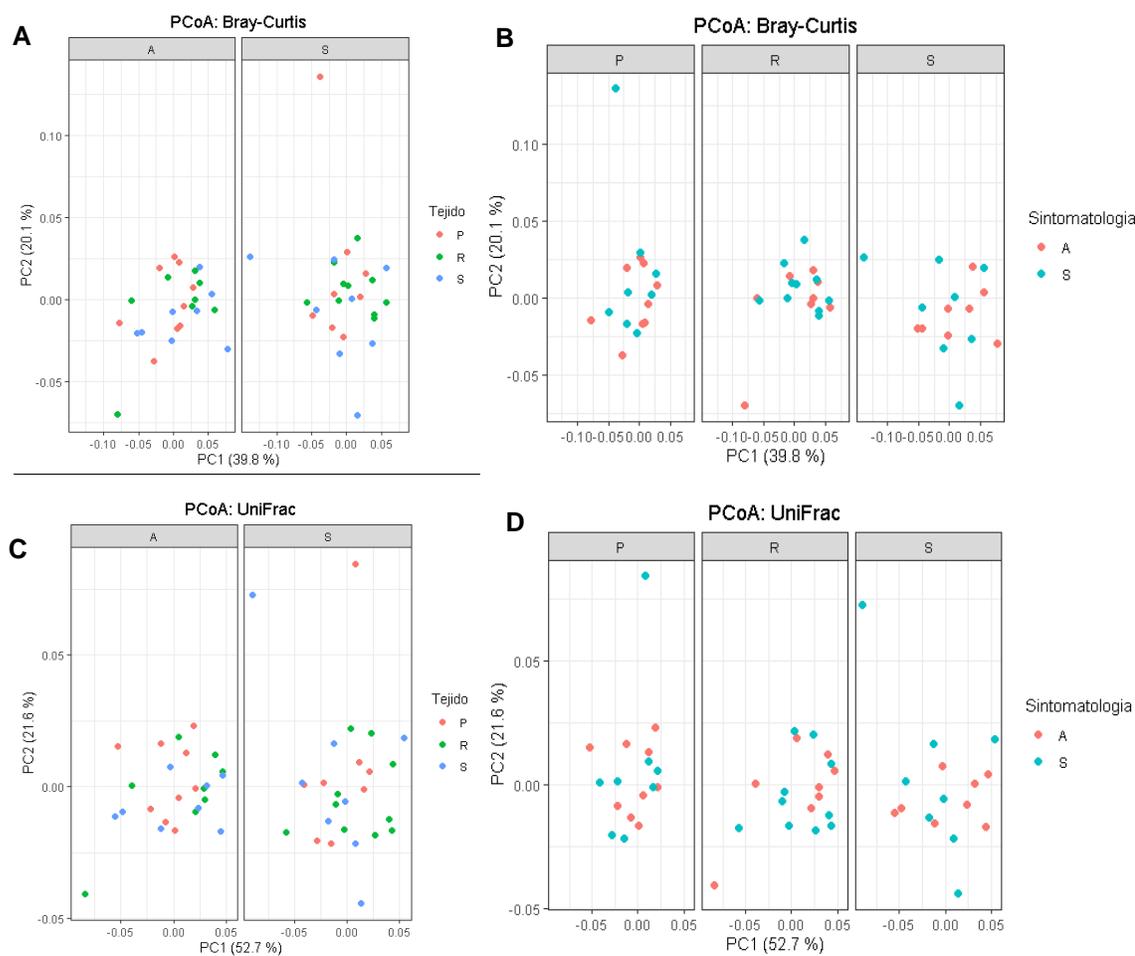


Nota. Los ejes indican el % de variación entre las coordenadas principales trazadas.

Se pueden observar que en ambas distancias métricas existe una clara separación de la población bacteriana de la rizosfera, lo cual no ocurre con las poblaciones del rizoma y pseudotallo (Figura 28 A, C). La agrupación con base en sintomatología permitió observar una ligera separación de las poblaciones sintomáticas y asintomáticas (Figura 28 B, D).

Figura 29

Diversidad Beta fúngica: PCoA. (A) Bray-Curtis: Tejido, (B) Bray-Curtis: Sintomatología, (C) UniFrac: Tejido y (D) UniFrac: Sintomatología



Nota. Los ejes indican el % de variación entre las coordenadas principales trazadas.

En cuanto a la diversidad Beta fúngica, los PCoAs realizados (Figura 29) no revelaron agrupación alguna ni en base a tejido ni a sintomatología. Sin embargo, cabe destacar que los gráficos obtenidos para las distancias métricas Bray-Curtis y UniFrac ponderado fueron consistentes.

Análisis estadístico

El análisis PERMANOVA realizado (usando matriz de distancias UniFrac ponderado) permitió probar el efecto significativo de la sintomatología a nivel ecológico, ver Tabla 8.

Tabla 8

PERMANOVA basado en distancia UniFrac ponderado para diferencias en la composición de la comunidad en base a sintomatología

Comunidad	Tejido	R ²	F	Valor P (>F)
Bacteriana	Pseudotallo	0.1648	3.1565	0.0092 **
	Rizoma	0.1023	1.9380	0.0868 *
	Rizosfera	0.1268	2.6141	0.0037 **
Fúngica	Pseudotallo	0.0357	0.5560	0.7307
	Rizoma	0.0201	0.3276	0.8675
	Rizosfera	0.0334	0.4842	0.7499

Nota. Códigos de significancia: 0.001 '***' 0.01 '**' 0.1 '*'

Se encontraron diferencias significativas relacionadas con la sintomatología en la comunidad bacteriana para pseudotallo (valor p <0.01), rizoma (valor p <0.1) y rizosfera (valor p <0.01). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la comunidad fúngica para ningún entorno.

Capítulo V: Discusión

El presente estudio buscó comprender la composición y distribución del microbioma de cultivos de banano Gros Michel infectados por Foc R1, con el fin de establecer perfiles taxonómicos asociados a plantas sintomáticas y asintomáticas para Fusariosis. Dicho fenómeno ha sido reportado previamente en cultivos de África oriental y Tanzania por Kaushal, Mahuku y colaboradores (2020), donde plantas de banano susceptibles permanecieron asintomáticas, mientras que bananos vecinos presentaron síntomas y sucumbieron a FWB (a pesar de tratarse de bananos multiplicados clonalmente). Lo cual contrasta con los miles de hectáreas de plantaciones comerciales del monocultivo Gros Michel que se eliminaron por completo tras la diseminación de Foc R1 en la década de 1960 (Ordonez et al., 2015).

Foc R4T no puede ser controlado efectivamente con las opciones de manejo actuales, es por ello que es necesario el desarrollo de estrategias de manejo integrales, sostenibles y ecológicas (Köberl et al., 2017). El uso de agentes biológicos para proteger y promover el crecimiento de las plantas es una alternativa atractiva para el control de FWB (Thangavelu & Gopi, 2015a). La mayoría de las investigaciones relacionadas se han centrado solamente en la microbiota bacteriana de raíces y del suelo de la rizosfera. Por lo que hay poca información sobre toda la diversidad microbiana asociada a los tejidos circundantes y los factores que influyen en ella (Kaushal, Swennen, et al., 2020). Con el fin de analizar las complejas interacciones de la microbiota de plantas de banano infectadas por Foc R1, la presente investigación hipotetizó la existencia de géneros bacterianos y fúngicos con abundancia relativa significativamente distinta, los cuales podrían predisponer o suprimir el desarrollo de FWB. Principalmente, parte de la microbiota endofítica del pseudotallo, rizoma y suelo

de la rizosfera, la cual coloniza los tejidos internos del huésped pudiendo estar en contacto directo con el hongo (Kaushal, Mahuku, et al., 2020).

El análisis de secuenciación Illumina MiSeq basado en amplicones del gen ADNr 16S (región V3-V4) permitió la determinación de perfiles taxonómicos bacterianos. La región hipervariable V3-V4 se ha usado ampliamente en análisis metataxonómicos de comunidades bacterianas (Fadeev et al., 2021; Kaushal, Mahuku, et al., 2020; Nishioka et al., 2019). En concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, Rausch y colaboradores (2019) reportaron un descenso en la calidad al final de las lecturas, atribuida a la longitud del amplicón 16S V3-V4 (~460 pb), lo cual disminuyó el solapamiento de las secuencias *forward* y *reverse*. Por otro lado, la intrusión de ADN vegetal puede afectar negativamente el análisis (Suhaimi et al., 2017), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la actual investigación donde el 44% de los ASVs bacterianos obtenidos correspondieron a eucariotas, cloroplastos y mitocondrias, por lo que se eliminaron perdiendo dicha información, lo cual resultó en la obtención de un mayor número de ASVs fúngicos (3,733,527) que bacterianos (693,720), resultados contrarios a los obtenidos por Kaushal, Swennen y colaboradores (2020).

Utilizando secuenciación por amplicones (ADNr 16S) y secuenciación *shotgun*, Kaushal, Mahuku, y colaboradores (2020) compararon la microbiota endofítica de raíces de plantas de banano (var. Mchare y Sukari Ndizi) sintomáticas y asintomáticas de campos infectados por Foc R1, los principales filos encontrados fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidota* y *Actinobacteria*. En un estudio similar realizado por Shen y colaboradores (2018) los filos más abundantes fueron *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidota* y *Actinobacteria*. Resultados semejantes a los de la presente investigación donde los filos dominantes de la comunidad bacteriana del suelo

de la rizosfera fueron *Proteobacteria*, *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota* y *Firmicutes* (Figura 9).

Los tejidos vegetales de las plantas de banano Gros Michel analizadas estuvieron dominadas por *Enterobacterales* (géneros *Klebsiella*, *Pectobacterium* y *Enterobacter*). (Figura 11), las cuales pueden proliferar en los tejidos de las plantas y transmitirse de generación en generación debido a las técnicas de proliferación y crecimiento del banano, consideradas como el bacterioma clave en las plantas de plátano (Liu et al., 2019).

Klebsiella, género predominante, ha sido reportado previamente como endófito del pseudotallo de banano por Rossmann y colaboradores (2012). Liu y colaboradores (2019) analizaron la estructura del microbioma de la endosfera de plantas de banano durante los procesos de crecimiento y marchitamiento por Foc R4T, donde *Klebsiella* se consideró como el taxón bacteriano crucial ya que se detectó durante los procesos de crecimiento y marchitez de la planta. Además, modificaron cepas endófitas de *Enterobacter* sp, *Kosakonia* sp y *Klebsiella* sp. para la expresión de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, enzima que reduce el nivel de etileno en raíces y que por lo tanto promueve el crecimiento de la planta con el fin de mejorar la resistencia a FWB, obteniendo los mejores resultados para las cepas modificadas de *Enterobacter* sp, *Kosakonia* sp. mientras que la inoculación de *Klebsiella* sp no aumento la resistencia a FWB (Liu et al., 2019). Contrario a la acción benéfica sugerida en dicho estudio, en la presente investigación el género *Kosakonia* se encontró en mayor abundancia en muestras de tejido vegetal sintomático (P=4% y R=8.3%) (Figura 11I).

Enterobacter fue el tercer género más abundante en muestras de tejido vegetal lo cual concuerda con Köberl y colaboradores (2017) que reportaron un incremento considerable de *Erwinia* y *Enterobacter* especialmente en las partes de la planta de banano que se encuentran por encima del suelo. Dicho género presentó abundancia diferencial en muestras asintomáticas (Tabla 6), contrario a los resultados presentados Köberl y colaboradores (2017) que lo reportaron en mayor abundancia en plantas sintomáticas para FWB en comparación con plantas sanas. Las especies identificadas *E. hormaechei* y *E. cloacae* se encontraron en abundancia diferencial en muestras de pseudotallo asintomático. Bubici y colaboradores (2019) reportaron que *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella variicola* y *E. cloacae* mostraron una actividad antagonista variable frente a Foc, presentándose como potenciales agentes de CB. Cabe destacar que el género *Enterobacter* comprende varias especies patógenas humanas oportunistas (ej., *E. aerogenes*, *E. cloacae*) (Berg et al., 2015).

Los géneros bacterianos más abundantes presentes las muestras asintomáticas de pseudotallo, rizoma y suelo de la rizosfera fueron *Pectobacterium*, *Klebsiella* y *Ca. Udaeobacter*, respectivamente (Figura 10). El género *Pectobacterium* presentó abundancia diferencial en muestras asintomáticas, tanto en pseudotallo como en rizoma, al contrario de lo reportado por Rossmann y colaboradores (2012) que encontraron a *Pectobacterium* exclusivamente en suelo, identificándolo como un patógeno vegetal.

Usando un enfoque de secuenciación por amplicones del gen 16S Köberl y colaboradores (2017) analizaron a la microbiota gammaproteobacteriana asociada a la rizosfera, raíces y pseudotallo, donde encontraron elevadas abundancias los órdenes *Pseudomonadales*, *Enterobacterales* y *Xanthomonadales*. Al igual que en la presente investigación los principales géneros encontrados del orden *Pseudomonadales* fueron

Acinetobacter y *Pseudomonas* (Figura 14). Así también, los principales géneros conjuntamente encontrados en el orden *Enterobacterales* fueron *Enterobacter*, *Citrobacter*. En cuanto al orden *Xanthomonadales* los géneros descubiertos en ambas investigaciones fueron *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas* y *Luteimonas*, *Rhodanobacter* (Köberl et al., 2017).

Microrganismos endófitos como *Bacillus* promueven el crecimiento de las plantas (producción de fitocromos, solubilización y absorción de nutrientes) y proporcionan un método eficaz y ambientalmente sostenible para proteger los cultivos contra los patógenos, por lo que son usados como agentes de CB (Bubici et al., 2019; Cao et al., 2018; Wang et al., 2017). El género *Bacillus* se encontró enriquecido en muestras de tejido vegetal asintomáticas (P=6.7%, R=5%) en comparación con muestras sintomáticas (P=0.2%, R=1.4%). Sin embargo, en el suelo de la rizosfera se encontró en proporción ligeramente mayor en muestras sintomáticas (1.7%) en relación a muestras asintomáticas (1.5%) (Figura 11). *Bacillus* spp., son probablemente las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas más destacadas, han sido ampliamente utilizadas y estudiadas debido a su capacidad de formar esporas y de producir lipopéptidos antimicrobianos (ej. surfactina e iturina) (Cao et al., 2018; Köberl et al., 2017). Cao y Colaboradores (2018) analizaron la actividad antifúngica de *B. velezensis* frente a *Foc* R4T y *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en ensayos de confrontación en placa, observando una inhibición significativa del crecimiento de los hongos. Los ensayos de invernadero en plantas de banano mostraron una reducción de hasta el 48% de la incidencia de FWB frente al grupo control. Además, se ensayaron extractos de lipopéptidos de los cuales la iturina logró la inhibición de la germinación de esporas de *Foc* R4T hasta ~60%.

Pseudomonas spp., se han investigado considerablemente debido a su eficacia en la colonización y promoción del crecimiento de las plantas, la supresión de fitopatógenos, a su capacidad de inducir resistencia sistémica a patógenos y a la expresión de sideróforos (Köberl et al., 2017; Shen et al., 2015; Thangavelu & Mustaff, 2012; Velandia, 2021; Wong et al., 2021). El género *Pseudomonas* se encontró en mayor abundancia en muestras asintomáticas de tejido vegetal (P=1%, R=2.3%), que en muestras sintomáticas (P=0.5%, R=0.5%). Sin embargo, en la rizosfera su abundancia fue mayor en muestras sintomáticas (1.3%) que en asintomáticas (0.8%) (Figura 11I). Resultados contrarios a los presentados por Kaushal, Mahuku, y colaboradores (2020) donde la composición taxonómica reveló una elevada colonización de las raíces asintomáticas por *Pseudomonadales* tanto en var. Mchare (16.80%) como en var. Sukari Ndizi (7.50%). Adicionalmente, en un análisis de la comunidad bacteriana de suelos favorables y supresores para FWB realizado por pirosecuenciación (16S V4-V5) se identificaron como géneros enriquecidos significativamente (valor $p < 0.05$) en suelos supresores a Gp4, Gp5 (filo Acidobacteria) y *Pseudomonas* (Shen et al., 2015). De manera similar Köberl y colaboradores (2017) reportaron mayor abundancia en plantas asintomáticas para FWB de varios géneros gammaproteobacterianos potencialmente supresores de patógenos, como *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*.

Herbaspirillum fue hallado con abundancia diferencial en muestras de rizoma asintomático (Tabla 6). Weber y colaboradores (2007), a través de ensayos de invernadero, demostraron el potencial de las bacterias endófitas diazotróficas *Burkholderia* spp. y *Herbaspirillum* spp. sobre la inhibición de las unidades de propagación de Foc y sobre la promoción del crecimiento de las plantas, proponiéndolas como posibles agentes de CB contra Foc R4T.

Las muestras de raíces de banano analizadas por Kaushal, Mahuku, y colaboradores (2020) exhibieron una abundancia significativamente menor del género *Bradyrhizobium* en muestras asintomáticas. En la actual investigación se obtuvo un resultado similar para *Bradyrhizobium* presentándose menor abundancia (1.1%) en muestras asintomáticas que en muestras sintomáticas (2.6%). Juntamente con *Nitrospira* fueron los géneros en mayor abundancia en muestras sintomáticas (2.6%) (Figura 11IV). Por lo que, se los propone como posibles géneros predisponente al desarrollo de FWB.

En Japón y China, la rotación de cultivos y el cultivo intercalado con plantas del género *Allium*, se han reportado en la prevención del marchitamiento por *Fusarium* de calabazas, espinaca, tomate y banano (Huang et al., 2012; Zhang et al., 2013). Mediante un análisis de secuenciación por amplicones 16S, Nishioka y colaboradores (2019) encontraron al género bacteriano *Flavobacterium* como predominante en la rizosfera de plantas del género *Allium*, las cuales suprimieron el marchitamiento por *Fusarium* en plántulas de pepino. De manera similar Shen y colaboradores (2018) reportaron a *Flavobacterium* y a subgrupos del filo *Acidobacteria* (*Gp4* y *Gp5*) como potenciales agentes de CB frente a FWB. Por el contrario, Kaushal, Mahuku y colaboradores (2020) observaron a *Flavobacteriales* en una fracción significativamente superior (12-21%) en la raíz sintomática correlacionándolos con el desarrollo de síntomas. En relación a la presente investigación el género *Flavobacterium* se presentó en mayor proporción en muestras sintomáticas (1.6%) que asintomáticas (0.3%) (Figura 11IV).

Los géneros *Kluyvera* (P=3.6%, R=3.3%), *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (P=1.2%, R=2.4%) y *Paenibacillus* (P=3.9%, R=0.4%) se encontraron en mayor proporción en muestras asintomáticas de tejido vegetal (Figura

111). En un estudio realizado por Dita y colaboradores (2014) para comprender la diversidad funcional microbiana de *Musa* spp., a través de un análisis de la región 16S, identificaron a *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Acinetobacter* como géneros bacterianos frecuentes, mismos géneros encontrados en el presente trabajo. Adicionalmente, algunos de los endófitos bacterianos encontrados *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* son conocidos por su capacidad de fijación biológica de nitrógeno (Kaushal, Swennen, et al., 2020); *Bacillus*, *Enterobacter* (sp. *cloacae*), *Paenibacillus* y *Pseudomonas* se destacan por producir auxinas como el ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido indol-3-piruvato (IPA) las cuales actúan como moléculas de señalización recíproca para promover el crecimiento de las plantas (Kaushal, Swennen, et al., 2020; Spaepen & Vanderleyden, 2011). Por ejemplo, Wong y colaboradores (2021) aplicaron un consorcio de agentes de CB usando *Pseudomonas aeruginosa* DRB1 y *Trichoderma harzianum* CBF2 a cultivos afectados por Foc R4T obteniendo plátanos de mayor biomasa y plantas de mayores proporciones.

En concordancia con los datos presentados por Kaushal, Swennen y colaboradores (2020) se reportó una elevada abundancia relativa de *Xanthomonadales* *Burkholderiales* en las muestras asintomáticas de rizoma, pseudotallo y suelo de la rizosfera (Figuras 12, 13 14).

Los hongos endófitos son parte de la comunidad microbiana encontrada en varios tipos de tejidos vegetales, presentan un amplio rango de interacciones simbióticas con la planta huésped (Zakaria & Aziz, 2018). Shen y colaboradores (2018) analizaron la comunidad fúngica del suelo de monocultivos de banano utilizando el marcador genético ITS, donde encontraron como filos predominantes a *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Zycomycota*. Resultados análogos a los de la presente investigación

siendo *Ascomycota* y *Basidiomycota* los filos dominantes en todos los tejidos, sin diferenciación en cuanto a sintomatología (Figura 16).

El género *Trichoderma* spp. es reconocido por sus atributos como agente de CB (Kaushal, Swennen, et al., 2020). *Trichoderma* se encontró presente en todos los entornos analizados (Figuras 21, 22, 23), sin embargo no fue de los más abundantes ni presentó abundancia diferencial en relación a sintomatología. En un estudio realizado por Dita y colaboradores (2014) para comprender la diversidad funcional microbiana de *Musa* spp. analizaron la comunidad fúngica (tefa-1á o ITS), donde los principales géneros encontrados fueron *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum*, también reportaron la inhibición significativa (hasta 85%) del crecimiento de Foc tras la inoculación a *T. asperellum*.

A pesar de que los datos procedentes de HTS han demostrado ser útiles para comprender las comunidades microbianas, la interpretación de los mismos es compleja ya que presenta varios desafíos estadísticos (Mbareche et al., 2020). Primero, la comunidad microbiana en cada muestra puede estar representada por números considerablemente diferentes entre secuencias (tamaño de librerías) reflejando la eficiencia diferencial del proceso de secuenciación en sí, más no una verdadera variación biológica (Weiss et al., 2017). En la presente investigación se encontraron diferencias sustanciales entre en el número de lecturas obtenidas para cada muestra, sobre todo en los datos de ITS2, ver Anexo 2.

Por otro lado, la gama completa de especies rara vez es alcanzada, por ejemplo, las muestras con relativamente pocas lecturas pueden tener distancias métricas infladas (diversidad Beta) ya que los ASVs auténticamente compartidos se puntúan erróneamente como únicos en las muestras con más secuencias (Lozupone et al.,

2010). Otro punto a considerar es que el número total de lecturas obtenidas en una muestra no refleja el número absoluto de microorganismos presentes, ya que es solo una fracción del ecosistema. Por ello, la inferencia de la abundancia de taxones en el ambiente original representa serios desafíos en los estudios de prospección microbiana (Weiss et al., 2017).

La inferencia de ASVs independiente para cada muestra (`pool = FALSE` en el algoritmo *dada*) permite que el tiempo de cálculo sea bajo (Benitez et al., 2021). Sin embargo, la combinación de información entre múltiples muestras aumenta la sensibilidad a los ASVs presentes en frecuencias muy bajas. El paquete de R DADA2 brinda dos tipos de agrupación (`pool = TRUE` o `pool = "pseudo"`) (Callahan, Wong, et al., 2019). La agrupación mejora la detección de secuencias raras representadas solo una vez (*singletons*) o dos veces (*doubletons*) en una muestra individual, pero varias veces en todas las muestras. La diversidad *Apha* evalúa la riqueza taxonómica en una población o muestra, una forma de estimar dicha riqueza es considerar la distribución de abundancia de las especies, incluyendo el número de *singletons* y *doubletons*, través del cálculo de índices de diversidad (ej., Chao1 y Shannon) (Hugerth & Andersson, 2017). En la presente investigación se realizó la inferencia de ASVs independiente, es decir que DADA2 no generó *singletons* por cada muestra sino por todo el estudio, disminuyendo la fiabilidad de los análisis de diversidad. Por lo tanto, es recomendable usar una agrupación al ejecutar el algoritmo *dada* permitiendo llamar a *singletons* por muestra (Benitez et al., 2021).

El recuento de ASVs fue mayor en el suelo de la rizosfera seguido en menor cantidad por el rizoma y pseudotallo, tanto para la comunidad fúngica como bacteriana (Figura 26), resultados similares a los de Kaushal, Swennen, y colaboradores (2020) obtenidos en muestras de rizosfera, raíces y rizoma. Así también, la mayoría de las

comunidades bacterianas y fúngicas presentes en las muestras de rizoma y pseudotallo prevalecieron en las muestras de rizosfera, lo cual sugiere que las comunidades bacterianas y fúngicas presentes en el tejido vegetal fueron colonizadas desde la rizosfera (Kaushal, Swennen, et al., 2020).

La elevada diversidad microbiana se ha correlacionado directamente con la resistencia a las invasiones por patógenos (Mallon et al., 2015). La comunidad bacteriana exhibió una mayor diversidad y riqueza en muestras asintomáticas en relación a muestras sintomáticas (Figura 27A), resultados registrados previamente por Kaushal, Swennen, y colaboradores (2020) donde la pérdida de riqueza en las muestras sintomáticas se atribuyó al estrés al cual es sometida la planta enferma ocasionando un descenso en el carbono disponible para los microorganismos de la rizosfera. En bananos afectados por marchitez bacteriana (siendo *Ralstonia solanacearum* el patógeno causal) se encontró una microbiota más diversa y abundante asociada a plantas no sintomáticas en comparación con plantas sintomáticas, reflejando una supresión del patógeno que retrasó o evitó el desarrollo de la enfermedad (Suhaimi et al., 2017).

En cuanto a la comunidad fúngica, Shen y colaboradores (2017) relacionaron su elevada riqueza en el suelo con un aumento de la incidencia de FWB (valor $p < 0.001$), y la disminución del rendimiento de los cultivos de banano, además de una mayor abundancia del género *Fusarium*. En el caso de la presente investigación tanto la diversidad observada como los índices de diversidad no mostraron diferencias considerables entre muestras sintomáticas y asintomáticas (Figura 27B) sugiriendo que una elevada diversidad fúngica no necesariamente es un factor determinante en el desarrollo de FWB, sino la elevada presencia del género *Fusarium*.

Mediante análisis PERMANOVA se determinó que la composición de la comunidad bacteriana se vio afectada significativamente ante la incidencia de la enfermedad, tanto en tejidos vegetales como en el suelo de la rizosfera, (Tabla 8), resultados concordantes con Shen y colaboradores (2017). El presente estudio demuestra la complejidad de las comunidades bacterianas y fúngicas (las cuales posiblemente interactúen entre sí y con el huésped) (Kaushal, Swennen, et al., 2020). Además de presentar a algunos taxones potencialmente indicadores de salud, los cuales posiblemente podrían contrarrestar a FWB.

Definitivamente, las prácticas con un potencial impacto positivo en la diversidad microbiana del suelo, como los cultivos intercalados, la agrosilvicultura y las enmiendas orgánicas del suelo enriquecidas con consorcios bacterianos benéficos, pueden ser recomendadas para mejorar la salud de las plantas y el rendimiento del cultivo del plátano (Köberl et al., 2017).

Capítulo VI: Conclusiones

La actual investigación presenta una visión integral de la microbiota fúngica y bacteriana asociada al suelo y tejido vegetal de cultivos de banano Gros Michel asintomáticos y sintomáticos para Fusariosis.

Se identificaron a géneros bacterianos (*Pectobacterium*, *Enterobacter* y *Herbaspirillum*) y fúngicos (*Fusarium* y *Rhodotorula*) con abundancia relativa significativamente distinta al comparar los perfiles taxonómicos de plantas de banano Gros Michel sintomáticas y asintomáticas para Fusariosis.

La variación en la composición y abundancia de la comunidad microbiana endofítica en las muestras permitió identificar microorganismos potencialmente beneficiosos para el control de Foc R1.

El análisis metataxonómico reveló que los miembros de la clase *Gammaproteobacterias*, específicamente miembros del orden *Enterobacterales*, y de la clase *Bacilli*, se presentan en mayor abundancia relativa y abundancia diferencial en muestras asintomáticas de tejidos vegetales, los cuales podrían servir como componentes clave en el crecimiento y salud de la planta, así como también agentes de CB frente a FWB.

La comunidad fúngica de todos los entornos está dominada por los géneros *Ascochyta* y *Antrodia*, tanto en muestras asintomáticas como sintomáticas. El análisis de abundancia diferencial reveló la presencia, significativamente mayor, de *F. oxysporum* y *R. mucilaginosa* en muestras sintomáticas y a miembros de la familia *Ceratobasidiaceae* en muestras asintomáticas de rizosfera.

El presente estudio reveló que las comunidades bacterianas del suelo de la rizosfera poseen mayor riqueza y diversidad que las comunidades del rizoma o pseudotallo.

Se encontraron diferencias significativas (valor $p < 0.1$) con base en sintomatología en la comunidad bacteriana para pseudotallo, rizoma y suelo de la rizosfera. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la comunidad fúngica para ningún entorno.

El estudio de las interacciones planta-microbiota, a través de la caracterización de endófitos de *Musa* sp. autóctonos y no cultivables, revelaron una diversidad alta de microorganismos con potencial para el desarrollo de nuevos productos y métodos para la mejora del crecimiento y rendimiento de los cultivo de banano, así como también para la defensa contra Foc R1.

Capítulo VII: Recomendaciones

Los cultivos sucesivos de banano (monocultivos) se han correlacionado significativamente con la incidencia de FWB y con la pérdida de diversidad en suelo. Por lo que, se sugiere analizar los cambios en la riqueza de la comunidad microbiológica anualmente con el fin de explorar las variaciones en los taxones a lo largo del tiempo.

Se recomienda cuantificar la presencia de Foc R1 en los cultivos de banano analizados, mediante PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR). Datos que servirán para analizar la influencia de la cantidad del patógeno en relación al desarrollo de la enfermedad.

Estudios previos demostraron cambios significativos en la microbiota antes y después del ataque del patógeno, por lo que se recomienda realizar análisis de cultivos libres de Foc con el fin de comparar la afectación de la microbiota.

La comprensión de las interacciones dentro y entre las comunidades de bacterias y hongos podría permitir una mejor comprensión de los cambios impuestos en las comunidades microbianas de cultivos de banano sintomáticos y asintomáticos para FWB. Con este antecedente se pone a consideración la aplicación de un análisis de redes, herramienta que permite explorar las interacciones dentro de un ecosistema que no se pueden observar directamente a través del análisis de co-ocurrencia.

Realizar la inferencia de ASVs considerando la agrupación de múltiples muestras (pool = TRUE o pool = "pseudo" en el algoritmo *dada*) para la detección de singletons y doubletons, los cuales permitirán un análisis de diversidades más confiable.

Llevar a cabo la clasificación taxonómica y la anotación funcional utilizando diferentes pipelines. Lo cual permitirá la comparación entre resultados de varios

pipelines generando resultados más confiables, además de brindar mejores oportunidades para explorar información no descubierta.

Realizar el aislamiento de *Enterobacterales* géneros *Pectobacterium*, *Enterobacter* y *Herbaspirillum* para su ensayo de su posible actividad antagonista contra Foc R1 *in vitro*.

Bibliografía

- Abubakr, A., Mustapha, M., & Zhang, G.-F. (2019). Seasonal Diversity of Endophytic Bacteria Associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. *Diversity* 2019, Vol. 11, Page 112, 11(7), 112. <https://doi.org/10.3390/D11070112>
- Alvarado, P. (2021, September 10). *COE Nacional: "El problema del Fusarium, que puede afectar al banano, es tan sensible que se lo ha puesto al mismo nivel del covid-19" - El Comercio*. EL COMERCIO. <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/coe-nacional-fusarium-banano-ecuador.html>
- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.STAT07841>
- Arevalo, P., VanInsberghe, D., Elsherbini, J., Gore, J., & Polz, M. F. (2019). A Reverse Ecology Approach Based on a Biological Definition of Microbial Populations. *Cell*, 178(4), 820-834.e14. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.06.033>
- Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador [AEBE]. (2018). *Foro Asociación de Exportadores de Banano*. <http://foroebe.com>
- Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics* 2017 18:2, 18(2), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12864-017-3501-4>
- Bareither, C. A., Wolfe, G. L., McMahon, K. D., & Benson, C. H. (2013). Microbial diversity and dynamics during methane production from municipal solid waste. *Waste Management*, 33(10), 1982–1992. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2012.12.013>
- Benitez, M. S., Malacrino, A., & Jelmer, P. (2021). *Microbiome Metabarcoding*

- Workshop*. Oklahoma State University. <https://mcic-osu.github.io/2020-12-microbiomics-workshop/index.html>
- Berg, G., Erlacher, A., & Grube, M. (2015). The edible plant microbiome: Importance and health issues. *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 419–426. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_44
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. In *Microbiome* (Vol. 8, Issue 1, p. 103). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 995. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERV466>
- Bollmann-Giolai, A., Giolai, M., Heavens, D., Macaulay, I., Malone, J., & Clark, M. D. (2020). *A low-cost pipeline for soil microbiome profiling*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1133>
- Brown, A., Tumuhimbise, R., Amah, D., Uwimana, B., Nyine, M., Mduma, H., Talengera, D., Karamura, D., Kuriba, J., & Swennen, R. (2017). Bananas and plantains (*Musa* spp.). In *Genetic Improvement of Tropical Crops* (pp. 219–240). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59819-2_7
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Cabanás, C. G. L., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against Fusarium wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P.

- (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Callahan, B., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3869>
- Callahan, B., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2019). Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, 5, 1–49. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8986.1>
- Callahan, B., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., McGill, S. K., & Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), e103–e103. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ569>
- Camino, K. (2018). *RESPUESTA DE GENOTIPOS DE BANANO Y PLÁTANO PROCEDENTES DE LA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DEL INIAP A MOKO (Ralstonia solanacearum) RAZA 2 EN CONDICIONES DE INVERNADERO* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/14447/1/T-ESPE-057890.pdf>
- Cao, Y., Pi, H., Chandransu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific*

- Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22782-Z>
- Castillo-Ortega, L., Molina-Vega, A., Olivares-García, E., Segovia-Cruz, J., & Aguirre-Van-Wobeser, E. (2018). La metagenómica y bioinformática: Descubriendo los secretos de la ecología microbiana. *Ciencias Biológicas y de La Salud*, 25–41.
- Cha, J. Y., Han, S., Hong, H. J., Cho, H., Kim, D., Kwon, Y., Kwon, S. K., Crusemann, M., Bok Lee, Y., Kim, J. F., Giaever, G., Nislow, C., Moore, B. S., Thomashow, L. S., Weller, D. M., & Kwak, Y. S. (2016). Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. *ISME Journal*, 10(1), 119–129. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2015.95>
- Chutulo, E. C., & Chalannavar, R. K. (2018). Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *azadirachta indica*: A comprehensive review. *Journal of Fungi*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/jof4020042>
- Clarridge, J. E., & III. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Dai, W., Mrkvička, T., Sun, Y., & Genton, M. G. (2020). Functional outlier detection and taxonomy by sequential transformations. *Computational Statistics & Data Analysis*, 149, 106960. <https://doi.org/10.1016/J.CSDA.2020.106960>
- Daly, A., & Walduck, G. (2006). *Fusarium Wilt of Bananas (Panama Disease)*. Northern Territory Government Department of Primary Industry, Fisheries and Mines.
- Damodaran, T., Rajan, S., Muthukumar, M., Ram Gopal, Yadav, K., Kumar, S., Ahmad, I., Kumari, N., Mishra, V. K., & Jha, S. K. (2020). Biological Management of Banana *Fusarium* Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 Using Antagonistic Fungal Isolate CSR-T-3 (*Trichoderma reesei*). *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.595845>

- Degnan, P. H., & Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal*, 6(1), 183. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2011.74>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 871, p. 1468). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Escobar-Zepeda, A., De León, A. V. P., & Sanchez-Flores, A. (2015). The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 6, Issue DEC, p. 348). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>
- Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 0, 283. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.637526>
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. In *Journal of Microbiological Methods* (Vol. 170, p. 105860). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860>
- FAOSTAT. (2021). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). *Food Outlook BIENNIAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS*. <http://www.fao.org/3/CA6911EN/CA6911EN.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). *The future of food and agriculture - Trends and challenges*. Rome.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). *Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets*. Rome: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (Issue November). <http://www.fao.org/3/CA6911EN/CA6911EN.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *BANANA MARKET REVIEW - Preliminary results 2020*.
- Forbes, J. D., Knox, N. C., Ronholm, J., Pagotto, F., & Reimer, A. (2017). Metagenomics: The next culture-independent game changer. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01069>
- Foster, Z. S. L., Sharpton, T. J., & Grünwald, N. J. (2017). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology*, 13(2), e1005404. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005404>
- García-Bastidas, F. A., Quintero-Vargas, J. C., Ayala-Vasquez, M., Schermer, T., Seidl, M. F., Santos-Paiva, M., Noguera, A. M., Aguilera-Galvez, C., Wittenberg, A., Hofstede, R., Sørensen, A., & Kema, G. H. J. (2020). First report of Fusarium Wilt Tropical race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. In *Plant Disease* (Vol. 104, Issue 3). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>
- Garrido, R. (2017). *Computational Methods for the Study of Plant-associated Microbial Communities*.
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 23–39. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080615-095919>
- Grosch, R., Dealtry, S., Schreiter, S., Berg, G., Mendonça-Hagler, L., & Smalla, K.

- (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani*: complex interaction of biocontrol strains, pathogen and indigenous microbial community in the rhizosphere of lettuce shown by molecular methods. *Plant and Soil* 2012 361:1, 361(1), 343–357.
<https://doi.org/10.1007/S11104-012-1239-Y>
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669–685.
<https://doi.org/10.1128/membr.68.4.669-685.2004>
- Hennessy, C., Walduck, G., Daly, A., & Padovan, A. (2005). Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in northern Australia. *Australasian Plant Pathology* 2005 34:1, 34(1), 115–117. <https://doi.org/10.1071/AP04091>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hu, L., Robert, C. A. M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., Manzo, D., Chervet, N., Steinger, T., van der Heijden, M. G. A., Schlaeppi, K., & Erb, M. (2018). Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05122-7>
- Huang, Y. H., Wang, R. C., Li, C. H., Zuo, C. W., Wei, Y. R., Zhang, L., & Yi, G. J. (2012). Control of *Fusarium* wilt in banana with Chinese leek. *European Journal of Plant Pathology* 2012 134:1, 134(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/S10658-012-0024-3>
- Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing. In *Frontiers in*

Microbiology (Vol. 8, Issue SEP, p. 1561). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561>

Hwang, S. C., & Ko, W. H. (2004). Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. In *Plant Disease* (Vol. 88, Issue 6, pp. 580–588). American Phytopathological Society.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.580>

Illumina. (2018). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System.*

https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

Illumina. (2019). *Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol. Preparing ITS Amplicons for Sequencing on Illumina Sequencing Systems.*

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-demonstrated-protocol-1000000064940-01.pdf

Illumina. (2021). *NGS Workflow Steps | Illumina sequencing workflow.*

<https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>

INIAP, I. N. de I. A. –. (2019). *Capacidad del INIAP frente a la enfermedad Fusarium oxysporum cubense Raza 4 Tropical en Musáceas.*

https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5398/1/GUÍA_R4T_FINAL_%281%29.pdf
https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5398/1/GUÍA_R4T_FINAL_%281%29.pdf

Jauk, F. (2019). *Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y*

aplicaciones. http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol23/n2_educacional/2-ROL

DE NGS EN PATOLOGIA MIELOIDE-jauk-n23-ext.pdf

- Ju, F., & Zhang, T. (2015). Experimental Design and Bioinformatics Analysis for the Application of Metagenomics in Environmental Sciences and Biotechnology. *Environmental Science and Technology*, 49(21), 12628–12640. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B03719>
- Karamura, D., Karamura, E., & Blomme, G. (2011). General Plant Morphology of Musa. *Banana Breeding*, 1–20. <https://doi.org/10.1201/B10514-2>
- Kaushal, M., Mahuku, G., & Swennen, R. (2020). Metagenomic insights of the root colonizing microbiome associated with symptomatic and non-symptomatic bananas in Fusarium wilt infected fields. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020263>
- Kaushal, M., Swennen, R., & Mahuku, G. (2020). Unlocking the Microbiome Communities of Banana (Musa spp.) under Disease Stressed (Fusarium wilt) and Non-Stressed Conditions. *Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 443*, 8(3), 443. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030443>
- Köberl, M., Dita, M., Martinuz, A., Staver, C., & Berg, G. (2017). Members of Gammaproteobacteria as indicator species of healthy banana plants on Fusarium wilt-infested fields in Central America. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep45318>
- Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Grządziel, J., Goraj, W., Gałązka, A., & Wolińska, A. (2020). Culture-independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L. (cv. 'Hondia') and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L. (cv. 'Rokosz'). *Systematic and Applied Microbiology*, 43(1), 126025. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2019.126025>
- Levy, A., Salas Gonzalez, I., Mittelviehhaus, M., Clingenpeel, S., Herrera Paredes, S., Miao, J., Wang, K., Devescovi, G., Stillman, K., Monteiro, F., Rangel Alvarez, B.,

- Lundberg, D. S., Lu, T. Y., Lebeis, S., Jin, Z., McDonald, M., Klein, A. P., Feltcher, M. E., Rio, T. G., ... Dangl, J. L. (2018). Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nature Genetics*, *50*(1), 138–150. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0012-9>
- Li, C., Mostert, G., Zuo, C., Beukes, I., & Yang, Q. (2013). Diversity and Distribution of the Banana Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* F. Sp. *cubense* in China. *Fungal Genomics & Biology*, *3*, 111. <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000111>
- Liu, P., & Prada, V. (2018). *World Banana Forum*.
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2020). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein and Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0690-x>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12). <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8>
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2010). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* *2011* 5:2, *5*(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>
- Luz, M. (2019). Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics and Informatics*, *17*(1). <https://doi.org/10.5808/GI.2019.17.1.e6>
- MAG. (2021, September 3). *COE Nacional, MAG y actores de la cadena de musáceas trazan hoja de ruta para evitar ingreso de Foc R4T – Ministerio de Agricultura y Ganadería*. <https://www.agricultura.gob.ec/coe-nacional-mag-y-actores-de-la->

cadena-de-musaceas-trazan-hoja-de-ruta-para-evitar-ingreso-de-foc-r4t/

- Magdama, F. (2019). Fusarium Oxysporum - El Hongo Más Temido En La Industria Del Banano. *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, 6(1), 19–22. <https://doi.org/10.36331/revista.v6i1.64>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. del M. (2020). Genetic Diversity of Fusarium oxysporum f. sp. cubense, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), 1133. <https://doi.org/10.3390/plants9091133>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Sosa, D., Geiser, D. M., & Jiménez-Gasco, M. del M. (2019). Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for Fusarium oxysporum f. Sp. Cubense Race 4 strains. *PLoS ONE*, 14(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222727>
- Mallon, C., Poly, F., Le Roux, X., Marring, I., van Elsas, J., & Salles, J. (2015). Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. *Ecology*, 96(4), 915–926. <https://doi.org/10.1890/14-1001.1>
- Marchesi, J., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-015-0094-5>
- Martino, E., Morin, E., Grelet, G.-A., Kuo, A., Kohler, A., Daghino, S., Barry, K. W., Cichocki, N., Clum, A., Dockter, R. B., Hainaut, M., Kuo, R. C., LaButti, K., Lindahl, B. D., Lindquist, E. A., Lipzen, A., Khouja, H.-R., Magnuson, J., Murat, C., ... Perotto, S. (2018). Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*, 217(3), 1213–1229. <https://doi.org/10.1111/NPH.14974>
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y. S., Subandiyah, S., Crous, P. W., & Kema, G. H. J. (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen

- Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology*, 92, 155–194. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.003>
- Massart, S., Perazzolli, M., Höfte, M., Pertot, I., & Jijakli, M. H. (2015). Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *BioControl* 2015 60:6, 60(6), 725–746. <https://doi.org/10.1007/S10526-015-9686-Z>
- Mbareche, H., Dumont-Leblond, N., Bilodeau, G. J., & Duchaine, C. (2020). An Overview of Bioinformatics Tools for DNA Meta-Barcoding Analysis of Microbial Communities of Bioaerosols: Digest for Microbiologists. *Life*, 10(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/LIFE10090185>
- McKnight, D. T., Huerlimann, R., Bower, D. S., Schwarzkopf, L., Alford, R. A., & Zenger, K. R. (2019). Methods for normalizing microbiome data: An ecological perspective. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(3), 389–400. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13115>
- McLaren, M., & Callahan, B. (2018). In nature, there is only diversity. In *mBio* (Vol. 9, Issue 1). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/mBio.02149-17>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061217>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Metzker, M. L. (2009). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* 2010 11:1, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Peru [MIDAGRI]. (2021, April 11). SENASA

confirma brote de Fusarium Raza 4 Tropical en Piura | Gobierno del Perú.

<https://www.gob.pe/institucion/senasa/noticias/429832-senasa-confirma-brote-de-fusarium-raza-4-tropical-en-piura>

MPbio. (2021). FastDNA Spin Kit For Soil - Metagenomic DNA Extraction & Isolation from Samples. <https://www.mpbio.com/us/116560600-fastdna-50ml-spin-kit-for-soil>

Nishioka, T., Marian, M., Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Tamaki, H., Suga, H., & Shimizu, M. (2019). Microbial basis of Fusarium wilt suppression by Allium cultivation. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37559-7>

Ohara, T., & Tsuge, T. (2004). FoSTUA, Encoding a Basic Helix-Loop-Helix Protein, Differentially Regulates Development of Three Kinds of Asexual Spores, Macroconidia, Microconidia, and Chlamydoconidia, in the Fungal Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1412. <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1412-1422.2004>

OIRSA Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. (2017). *PLAN DE CONTINGENCIA ANTE UN BROTE DE LA RAZA TROPICAL DE Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Vol. 2.*

Omomowo, O. I., & Babalola, O. O. (2019). Bacterial and Fungal Endophytes: Tiny Giants with Immense Beneficial Potential for Plant Growth and Sustainable Agricultural Productivity. *Microorganisms 2019, Vol. 7, Page 481*, 7(11), 481. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7110481>

Ordonez, N., Seidl, M. F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P. H. J., Ploetz, R. C., & Kema, G. H. J. (2015). Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. *PLOS Pathogens*, 11(11), e1005197. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005197>

- Parsons, J. J. (1957). Bananas in Ecuador: A New Chapter in the History of Tropical Agriculture. *Economic Geography*, 33(3), 201. <https://doi.org/10.2307/142308>
- Pegg, K. G., Coates, L. M., O'Neill, W. T., & Turner, D. W. (2019). The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 0, 1395. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01395>
- Pipan, B., Zupančič, M., Blatnik, E., Dolničar, P., & Meglič, V. (2018). Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus X domestica*). *Http://Www.Editorialmanager.Com/Cogentagri*, 4(1), 1540094. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1540094>
- Ploetz, R. (2009). Assessing threats posed by destructive banana pathogens. *Acta Horticulturae*, 828, 245–252. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2009.828.25>
- Ploetz, R. C. (2005). Panama Disease: An Old Nemesis Rears Its Ugly Head: Part 1. The Beginnings of the Banana Export Trades. *Plant Health Progress*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.1094/PHP-2005-1221-01-RV>
- Ploetz, R. C., & Evans, E. A. (2015). The future of global banana production. *Horticultural Reviews*, 43, 311–351. <https://doi.org/10.1002/9781119107781.CH06>
- Porcher, M. (2011). *Sorting Musa names*. The University of Melbourne. <https://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Musa.html>
- Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>
- Proença, D. N., Francisco, R., Kublik, S., Schöler, A., Vestergaard, G., Schloter, M., & Morais, P. V. (2017). The Microbiome of Endophytic, Wood Colonizing Bacteria from Pine Trees as Affected by Pine Wilt Disease. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04141-6>

- Promega Corporation. (2019). Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit
Wizard® Genomic DNA Purification Kit. *Technical Bulletin*, 1–19.
www.promega.com
- Rausch, P., Rühlemann, M., Hermes, B. M., Doms, S., Dagan, T., Dierking, K., Domin, H., Fraune, S., Frieling, J. von, Hentschel, U., Heinsen, F.-A., Höppner, M., Jahn, M. T., Jaspers, C., Kissoyan, K. A. B., Langfeldt, D., Rehman, A., Reusch, T. B. H., Roeder, T., ... Baines, J. F. (2019). Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. *Microbiome* 2019 7:1, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S40168-019-0743-1>
- Riera, N. (2015). *Caracterización molecular y de patogenicidad de Colletotrichum spp, en bananas var Cavendish y pruebas de antagonismo con Trichoderma spp., recolectadas en fincas bananeras de la región costa del Ecuador*. USFQ, Quito.
- Robinson, J., & Galán, V. (2010). *Plátanos y bananas*. Mundi-Prensa.
- Rossmann, B., Müller, H., Smalla, K., Mpiira, S., Tumuhairwe, J. B., Staver, C., & Berg, G. (2012). Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4933–4941. <https://doi.org/10.1128/AEM.00772-12>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2).
<https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Saad, M. M., Eida, A. A., & Hirt, H. (2020). Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3878. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA111>

- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012, 1–6.
<https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Shen, Z., Ruan, Y., Xue, C., Zhong, S., Li, R., & Shen, Q. (2015). Soils naturally suppressive to banana Fusarium wilt disease harbor unique bacterial communities. *Plant and Soil* 2015 393:1, 393(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/S11104-015-2474-9>
- SIPA. (2021). *SISTEMA DE INFORMACIÓN PÚBLICA AGROPECUARIA*. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA. <http://sipa.agricultura.gob.ec/>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), e59.
<https://doi.org/10.1002/CPMB.59>
- Solomon, E., & Matthews, K. (2005). Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *Journal of Food Protection*, 68(4), 870–873. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.870>
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), 1–13.
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001438>
- Sudarshan, S., Lahti, L., Gerben, H., & Hauke, S. (2018). *Microbial bioinformatics introductory course material 2018*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1436630>
- Suhaimi, S., Goh, S.-Y., Ajam, N., Yasmin Othman, R., Chan, K.-G., & Lin Thong, K. (2017). Diversity of microbiota associated with symptomatic and non-symptomatic bacterial wilt-diseased banana plants determined using 16S rRNA metagenome sequencing. *World J Microbiol Biotechnol*, 33(3), 168.

<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2336-0>

- Sundström, J. F., Albiñ, A., Boqvist, S., Ljungvall, K., Marstorp, H., Martiin, C., Nyberg, K., Vågsholm, I., Yuen, J., & Magnusson, U. (2014). Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases - a risk analysis in three economic and climate settings. *Food Security*, 6(2), 201–215. <https://doi.org/10.1007/s12571-014-0331-y>
- Thangavelu, R., & Gopi, M. (2015a). Field suppression of Fusarium wilt in banana using combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 241–252. https://doi.org/10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-15160
- Thangavelu, R., & Gopi, M. (2015b). Combined application of native Trichoderma isolates possessing multiple functions for the control of Fusarium wilt disease in banana cv. Grand Naine. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/09583157.2015.1036727*, 25(10), 1147–1164. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1036727>
- Thangavelu, R., & Mustaff, M. M. (2012). Current Advances in the Fusarium Wilt Disease Management in Banana with Emphasis on Biological Control. In *Plant Pathology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/33775>
- Tkacz, A., & Poole, P. (2015). Role of root microbiota in plant productivity. *Journal of Experimental Botany*, 66(8), 2167–2175. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERV157>
- Trivedi, U. H., Cézard, T., Bridgett, S., Montazam, A., Nichols, J., Blaxter, M., & Gharbi, K. (2014). Quality control of next-generation sequencing data without a reference. *Frontiers in Genetics*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2014.00111>
- Vancov, T., & Keen, B. (2009). Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 91–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01621.x>

- Velandia, C. (2021). *Diseño de un control biológico para el hongo Fusarium oxysporum f.sp. cubense, agente causal del Mal de Panamá, empleando Pseudomonas fluorescens recombinante para la sobreexpresión de sideróforo.*
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24127/1/T-ESPE-043421.pdf>
- Vézina, A., Van-den-Bergh, I., & Rouard, M. (2020). *Morphology of the banana plant.* Musapedia, the Banana Knowledge Compedium.
<https://www.promusa.org/Morphology+of+banana+plant>
- Voříšková, J., Elberling, B., & Priemé, A. (2019). Fast response of fungal and prokaryotic communities to climate change manipulation in two contrasting tundra soils. *Environmental Microbiome*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S40793-019-0344-4>
- Wang, R., Zhang, H., Sun, L., Qi, G., Chen, S., & Zhao, X. (2017). Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00472-6>
- Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J. R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E. R., & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Weller, D., Raaijmakers, J., Gardener, B., & Thomashow, L. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 309–348.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYTO.40.030402.110010>
- Wong, C. K. F., Zulperi, D., Saidi, N. B., & Vadamalai, G. (2021). A Consortium of *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* for Improving Growth and Induced Biochemical Changes in *Fusarium* Wilt Infected Bananas. *Tropical Life*

Sciences Research, 32(1), 23. <https://doi.org/10.21315/TLSR2021.32.1.2>

Wu, T., Chellemi, D., Graham, J., Martin, K., & Roskopf, E. (2008). Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microbial Ecology*, 55(2), 293–310.

<https://doi.org/10.1007/S00248-007-9276-4>

Zakaria, L., & Aziz, W. N. W. (2018). Molecular Identification of Endophytic Fungi from Banana Leaves (*Musa* spp.). *Tropical Life Sciences Research*, 29(2), 201.

<https://doi.org/10.21315/TLSR2018.29.2.14>

Zhang, H., Mallik, A., & Zeng, R. Sen. (2013). Control of Panama Disease of Banana by Rotating and Intercropping with Chinese Chive (*Allium Tuberosum* Rottler): Role of Plant Volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 2013 39:2, 39(2), 243–252.

<https://doi.org/10.1007/S10886-013-0243-X>

Anexos