



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**



Universidad de Granada

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

**El microbioma de olivo en condiciones de estrés a-biótico:  
posibilidades biotecnológicas para incrementar la resiliencia del olivar**

**Nuria Martín Wentzien**

**Tesis Doctoral**

**Granada, 2024**

Dirigida por los Doctores Manuel Fernández López y Antonio José Fernández González

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Nuria Martín Wentzien  
ISBN: 978-84-1195-347-4  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92588>



La Tesis Doctoral aquí presentada fue desarrollada gracias a la financiación recibida por diferentes proyectos de investigación, que se detallan a continuación:

- “Estrategias basadas en aproximaciones ‘-ómicas’ para el manejo de la Verticilosis del olivo: Genómica comparada de patotipos y cambios inducidos en el microbioma de la raíz”. Proyecto concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad con referencia AGL2016-75729-C2-1-R y realizado entre 2016 y 2019.
- “Estrategias basadas en aproximaciones ‘-ómicas’ para el manejo de la Verticilosis del olivo (OVerMan)”. Proyecto financiado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con referencia 2019AEP195 y realizado entre enero y mayo de 2020.
- “El holobionte olivo: vinculando el microbioma vegetal y la tolerancia del huésped a estreses bióticos y abióticos (BIOLIMITS)”. Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, con referencia PID2019-106283RB-I00 y realizado entre junio de 2020 y mayo de 2024.
- “The soil biodiversity and functionality of Mediterranean olive groves: A holistic analysis of the influence of land management on olive oil quality and safety”. Proyecto financiado por la Unión Europea, HE Soil Health, con referencia HE/MISS-SOIL/0199. Duración desde enero 2023 hasta diciembre 2027.
- Ayuda para la financiación de un contrato predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU, ref. FPU18/01926), concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2019-2023).
- Ayuda para la realización de una estancia breve en el extranjero asociada al contrato predoctoral (ref. EST22/00225), realizada en el laboratorio liderado por la Dr. Prof. Grabiele Berg, dentro del Instituto de Biotecnología Medioambiental (Graz, Austria).

Una gran parte de los resultados presentados en esta memoria de Tesis Doctoral han sido publicados y se presentan a continuación:

- Fernández-González, A. J., **Wentzien, N. M.**, Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Lasa, A. V., Gómez-Lama Cabanás, C., ... & Fernández-López, M. (2020). Comparative study of neighbouring Holm oak and olive trees-belowground microbial communities subjected to different soil management. *PLoS One*, *15*(8), e0236796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236796>.
- **Wentzien, N. M.**, Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2023). Thriving beneath olive trees: The influence of organic farming on microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *21*, 3575-3589. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.07.015>.
- **Wentzien, N. M.**, Fernández-González, A. J., Valverde-Corredor, A., Lasa, A. V., Villadas, P. J., Wicaksono, W. A., ... & Mercado-Blanco, J. (2024). Pitting the olive seed microbiome. *Environmental Microbiome*, *19*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00560-x>.

Además, la doctoranda también participó en las siguientes publicaciones y congresos:

- Gómez-Lama Cabanás, C., **Wentzien, N. M.**, Zorrilla-Fontanesi, Y., Valverde-Corredor, A., Fernández-González, A. J., Fernández-López, M., & Mercado-Blanco, J. (2022). Impacts of the biocontrol strain *Pseudomonas simiae* PICF7 on the Banana Holobiont: alteration of root microbial co-occurrence networks and effect on host defense responses. *Frontiers in microbiology*, *13*, 809126. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.809126>
- Fernández-González, A. J., **Wentzien, N. M.**, Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Lasa, A. V., Gómez-Lama Cabanás, C., Mercado-Blanco, J. & Fernández-López, M. (2019). Presentación de póster: "Comparative study of neighboring tree-associated belowground microbial communities

subjected to different soil management” en el Congreso Internacional Microbiotec’ 19 celebrado en Coimbra (Portugal) por la Sociedad Portuguesa de Microbiología (SPM) y la Sociedad Portuguesa de Biotecnología (SPBT) el 7/12/2019.

- Fernández-González, A. J., **Wentzien, N. M.**, Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Lasa, A. V., Gómez-Lama Cabanás, C., Mercado-Blanco, J. & Fernández-López, M. (2021). Presentación oral bajo el título: “Estudio comparativo de las comunidades microbianas rizosféricas de encina y olivo: efecto del manejo agrícola y tolerancia a verticilosis” en la IV reunión del grupo de Microbiología de Plantas (MiP 2021), organizado por la Sociedad Española de Microbiología y celebrado el 16/02/2021.
- **Wentzien, N. M.**, Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2022). Presentación de póster bajo el título: “Effects of agricultural management on the olive tree root microbiome” en el Congreso Internacional Ecology of Soil Microorganisms, organizado por la Academia de Ciencias Checas en Praga (República Checa) entre el 19/06/2022 y el 23/06/2022.
- **Wentzien, N.M.**, Fernández-González, A. J., Valverde-Corredor, A., Lasa, A. V., Villadas, P. J., Wicaksono, W. A., Cernava, T., Berg, G., Fernández-López, M., Mercado-Blanco, J. (2023). Presentación de póster bajo el título: “Explorando la diversidad microbiana en las semillas del olivo” en el XXIX Congreso de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) organizado por la Sociedad Española de Microbiología celebrado entre el 25/06/2023 y el 28/06/2023.

# **AGRADECIMIENTOS**



Creo que el tiempo es, sin duda, uno de los mayores enigmas para el ser humano, fuente inagotable de nostalgias, dudas y alegrías. Me imagino que todos os identificaréis con esa sensación confusa que sucede cuando os paráis a reflexionar sobre el tiempo, presente y pasado, siendo incapaces de determinar el por qué su medida os parece tan diferente de un momento a otro. Y es que tendemos a adoptar ideas tan equivocadas como la de que perdemos el tiempo, como si este fuera un recurso más que usar (a lo que estamos muy acostumbrados en esta sociedad) en vez de verlo como lo que es, un mar infinito en el que flotamos plácidamente, sorteando con más o menos peripecia las olas de la vida. Aquí me encuentro yo mientras escribo estas palabras, flotando sobre el tiempo y observando las olas que dejé atrás, aquellas que han conformado los últimos cuatro años de mi vida. En esta observación, me doy cuenta de que puedo elegir cómo ver las gotas que formaban estas olas y, no sé vosotros, pero creo que desde el agradecimiento todo se ve mejor.

Primero de todo, como unos grandes maestros me enseñaron, quiero agradecer a esas dos personas que decidieron darme el gran regalo de la vida: mis padres. Mirando ahora mucho más atrás de estos cuatro años, vosotros me habéis dado los valores de los que estoy orgullosa de tener hoy día, que me hacen ser la persona que amo ser. Gracias por enseñarme a admirar la naturaleza, los viajes, la música, a tratar con respeto a las personas y al mundo. Os quiero.

Gracias a ti Joan por ser el compañero de tantas cosas, por todas las aventuras y viajes, por acompañarme a conocer lo que de verdad debería ser el amor, por escucharme y por escucharte. Gracias por ser TÚ ese chico artístico, espontáneo y divertido del que siempre me enamoraré. Gracias por seguir ahí cuando lo quería dejar todo de lado y cuando no creía en mí; pero sobre todo, gracias por seguir ahí cuando me redescubrí y salí del caparazón, porque no todos se atreven a quedarse cuando los cambios ocurren.

Si cada ola en estos cuatro años ha tenido mucho que decir, la de este último ha sido especialmente significativa para mí. Gracias Tata por ser hermana y maestra, porque gracias a ti, sueño, río, vivo y creo de otra manera: desde la alegría y la felicidad.

## AGRADECIMIENTOS

---

Gracias también por ser como eres, por las interminables risas y por tu espontaneidad: contigo me siento en casa. Gracias por darme la alegría de ser tía, porque vosotros, India, Nayeli, Iris y Eiden, me hacéis volver a ser niña una y otra vez.

Quiero agradecer a otro gran maestro de la vida: Álvaro. Las largas conversaciones entre capítulo y capítulo de Tesis, junto a un buen café y tostada de jamón (que no falte), me hicieron cambiar radicalmente mi concepción de la vida y os aseguro que ya no quiero volver atrás. Gracias por hacerme sentir una más de la familia.

En lo profesional, gracias Manolo por haberme abierto y abrirme las puertas de tu laboratorio, dándome la oportunidad de comenzar el gran viaje de la Ciencia y de la docencia universitaria. También agradezco los momentos tensos, porque creo que me han mostrado muchos aspectos a mejorar de mí misma con los que he crecido enormemente como persona. Gracias a Hurry por acompañarme desde cerca, no solo por lo científico, donde has sido un gran mentor y maestro, sino por lo personal, por tu habilidad para contar grandes historias, por los chistes, las risas, los ánimos y la comprensión. Gracias Anita, por tener siempre tiempo para hablar y escucharme, siendo una inspiración de cómo se puede ser una gran científica y una gran fiestera fuera del laboratorio. Por todo eso y más, ¡eskerrik asko! Gracias Pablo por guiarme con paciencia y cariño en cómo manejarme en el laboratorio. A ti Jesús, gracias de verdad por enseñarme tanto respecto a redacción científica y pensamiento crítico. Más allá del laboratorio, la docencia en el Departamento de Microbiología ha sido para mí una experiencia que nunca olvidaré y aquí quiero agradecer a Jessica por haber sido tan cercana y ayudarme con los nervios del principiante.

Como ya he dicho antes, el viaje y el movimiento han sido y serán partes cruciales en mi vida. Por eso, quiero agradecer a todas esas personas que me han hecho sentir que mi hogar está en cualquier parte del mundo. Gracias a Juan por darme un hogar en Granada, por ser ese amigo que nunca te imaginas que encontrarás y que se termina convirtiendo en familia. Creo que eres de las personas con las que más puedo divertirme y con la que he podido llorar más tranquila, te quiero amigo. Un poco más lejos de Granada, a unos 2.500 km, se encuentra Graz, ciudad austríaca donde realicé mi estancia predoctoral. Aquí, además de agradecer a los tremendos científicos que me recibieron y mentorizaron, tengo que agradecer a Kathy por abrirme su casa en los primeros y

## AGRADECIMIENTOS

---

solitarios días, invitándome a deliciosas sopas colombianas que calentaban no solo el cuerpo sino el corazón. Tú fuiste una pieza clave en mi aprendizaje como persona y gracias a ti pude conocer a muchas más personas maravillosas en Graz, como Leonor y Francesca.

Quiero hacer especial mención a FPU Investiga, que más que una asociación por la lucha de los derechos predoctorales, es un grupo de personas que miran más allá de sí mismas para crear un mundo mejor. Es por eso por lo que con ellos las cosas solo pueden salir bien. Gracias por enseñarme tanto sobre nuestra precaria situación laboral y por hacerme partícipe de un hecho histórico en la lucha de los derechos predocs: conseguir la indemnización por finalización de contrato que durante tanto tiempo nos estuvieron negando. Gracias por lo personal, por enseñarme que mi tesis no soy yo y que se puede vivir la Ciencia desde un lugar más sano y equilibrado.

No quiero despedir esta sección sin mencionar a todas esas personas que hacen el día a día más ameno y que, con pequeñas acciones, me enseñaron mucho de la vida. En el trabajo, gracias a Lola, Sensi, Tita, Paco, Chema, Fernando, Natalia, Sabina, Esperanza y Virginia. En lo personal, gracias a los amigos y amigas que han llenado los días de conversaciones y risas (en especial a Dina, que entre risa y risa me ayudó a diseñar la maravillosa portada de esta Tesis).



# RESUMEN



**RESUMEN**

El olivo es un cultivo de enorme relevancia para la sociedad, la cultura y economía de la Cuenca Mediterránea. La producción de su aceite supone una importante fuente económica para numerosos países, siendo España el primer productor y exportador del mundo. Sin embargo, este cultivo se está viendo cada vez más amenazado por diversos estreses, tanto bióticos como abióticos, que se relacionan y agravan con los fenómenos asociados al cambio climático. Dentro de estos estreses, cabe destacar el manejo agrícola aplicado, cuya tendencia en las últimas décadas se acerca a modelos intensivos o súper intensivos (con densidades de 200 a 2.500 árboles/ha), con un alto uso de productos fitosanitarios y una mayor mecanización de la recolección. Esto acarrea diversos impactos medioambientales que afectan tanto a la biodiversidad de flora, fauna y microorganismos, así como a la salud del suelo. Como resultado, se generan ecosistemas menos resilientes frente a estreses abióticos, como los debidos al cambio climático, algo especialmente relevante en la Cuenca Mediterránea, o a factores bióticos como el ataque de patógenos. Además, el manejo agrícola tiene un impacto en las comunidades microbianas del suelo y asociadas a la planta, las cuales se encuentran en estrecha relación con la salud vegetal. Así, existe un creciente interés por implementar prácticas agrícolas más sostenibles, donde destacan técnicas como la inoculación de microorganismos beneficiosos para la planta o el uso de prácticas agrícolas más respetuosas con las comunidades microbianas del suelo y de la planta. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se abordó el objetivo de estudiar el microbioma de la raíz y del suelo rizosférico del olivo en respuesta a diversos tipos de estrés, como el manejo agrícola aplicado y la verticilosis del olivo. Asimismo, se planteó el estudio de reservorios de microorganismos menos explorados, tales como la endosfera radicular y la semilla del olivo. En este sentido, se realizaron aislamientos de bacterias a partir de raíces de olivo y se describió, por primera vez, la microbiota de la semilla.

En primer lugar, esta Tesis Doctoral se basa en el uso de la secuenciación masiva para la caracterización de las comunidades microbianas asociadas al sistema radicular

## RESUMEN

---

del olivo, generando grandes cantidades de datos que requieren herramientas bioinformáticas especializadas para su análisis. La diversidad y complejidad de estas herramientas, junto con la necesidad de formación específica por parte del usuario/investigador, afectan en gran medida a la reproducibilidad de los análisis. Para abordar este aspecto, se desarrolló un flujo de trabajo con una librería de funciones en R, que combina la facilidad de uso e implementación con la capacidad de personalización del análisis ([https://nuriawm.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriawm.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)). Esta herramienta ha sido fundamental tanto para el análisis de datos de la Tesis Doctoral como para investigaciones de varios grupos de investigación, demostrando su utilidad en distintos contextos científicos.

Por otro lado, para investigar el impacto del manejo agrícola en las comunidades microbianas de la raíz del olivo, se llevaron a cabo dos estudios independientes. El primero se centró en el estudio de la comunidad rizosférica de un olivar convencional y de un bosque de encinas adyacente al mismo. El segundo consistió en el estudio de las comunidades rizosféricas y endófitas de olivos en fincas cercanas con dos manejos agrícolas diferentes: uno convencional y otro orgánico con estiércol de oveja. Los resultados de ambos estudios demostraron la influencia del manejo agrícola en las comunidades microbianas a diversos niveles. En primer lugar, se encontró un mayor contenido de nutrientes en el suelo, tanto en el bosque de encinas como en el olivar bajo manejo orgánico, lo que sugiere que prácticas agrícolas convencionales tales como el arado y retirada de material vegetal afectan negativamente a las propiedades nutricionales del suelo. Por otro lado, tanto la diversidad  $\alpha$  como la  $\beta$  fueron diferentes entre los manejos agrícolas estudiados, tanto en las comunidades de la rizosfera como de la endosfera. Además, la biomasa fúngica de la rizosfera fue significativamente mayor en los olivos crecidos bajo un manejo orgánico, lo que podría aumentar la presencia de hongos con funciones beneficiosas para la planta. A nivel de composición taxonómica, tanto la comunidad bacteriana como la fúngica se vieron afectadas de manera acorde al manejo aplicado. Los suelos de olivares más pobres en nutrientes se vieron enriquecidos en taxones oligotróficos y asociados a menor contenido de agua en el suelo, como *Acidobacteria* y *Gemmatimonadetes*. En estas fincas, se encontró una mayor abundancia relativa de géneros relacionados con la degradación de herbicidas y

pesticidas, tales como *Rubrobacter* y *Sphingomonas*. Por su parte, en la finca con manejo orgánico, se observó un enriquecimiento en géneros fúngicos relacionados con producción de compuestos antimicrobianos y promoción del crecimiento vegetal (*Preussia* y *Cladophialophora*). Además, el manejo orgánico se asoció con un aumento en funciones metabólicas bacterianas relevantes para la planta, como el ciclo del nitrógeno (*Nitrospira*), degradación de compuestos aromáticos y defensa frente a patógenos (quitinolisis). Por último, las redes de coocurrencia microbiana mostraron una mayor complejidad de la red y una menor distancia geodésica media (GD) en la finca con manejo orgánico, lo que se relaciona con comunidades más resilientes a perturbaciones. Los resultados aquí descritos sientan un precedente en cuanto al microbioma del olivo, ya que no se encuentran hasta la fecha estudios en este respecto que incluyesen comunidad bacteriana, fúngica, endosfera y rizosfera, así como determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo, biomasa microbiana y análisis de redes de coocurrencia en condiciones de campo.

Si bien el manejo agrícola constituye un estrés abiótico para el olivar, la verticilosis del olivo podría considerarse como uno de los estreses bióticos más devastadores de este cultivo. En esta Tesis Doctoral, se abordó por primera vez el estudio de la microbiota de la rizosfera de olivos crecidos en condiciones de campo con tolerancias diferenciales a la verticilosis, esto es, usando los genotipos modelo de tolerancia y susceptibilidad, Frantoio y Picual, respectivamente. Según nuestros resultados, no se encontró una diferencia clara entre las comunidades bacterianas y fúngicas de la rizosfera de ambos genotipos, lo que podría relacionarse con el manejo agrícola aplicado. Futuros estudios serán necesarios para elucidar si las diferencias podrían observarse en la endosfera de la raíz.

En cuanto al estudio de reservorios poco explorados de microorganismos potencialmente beneficiosos para el olivar, se abordó el aislamiento de microorganismos de la endosfera radicular. Debido a resultados anteriores que apuntan a la importancia del género *Actinophytocola* en la comunidad bacteriana de la endosfera radicular del olivo, se llevaron a cabo diversos métodos de aislamiento para obtener aislados de este género. Ninguno de ellos resultó exitoso, si bien se obtuvieron aislados de otros géneros de interés biotecnológico, tales como *Streptomyces*, *Nocardia*, *Kocuria*,

## RESUMEN

---

*Paenibacillus* y *Rhizobium*. Estos resultados constituyen el primer aislamiento publicado de bacterias de estos géneros a partir de la endosfera de olivo, sentando las bases para futuros estudios centrados en su caracterización taxonómica y funcional, y su posible utilización como inoculantes beneficiosos para el cultivo del olivo.

Otro reservorio de microorganismos completamente desconocido en el caso del olivar es la semilla del olivo. En esta Tesis Doctoral, se describe por primera vez un procedimiento para la obtención de semillas de olivo en condiciones de esterilidad, así como la composición de las comunidades bacterianas y fúngicas que las colonizan. Según nuestros resultados, la microbiota de la semilla de olivo presentó características únicas respecto al de otras especies vegetales. Destaca la presencia de *Actinobacteria* como el phylum bacteriano más abundante, con *Streptomyces* como el género más abundante. *Basidiomycota* y *Ascomycota* fueron los phyla fúngicos predominantes, representados por los géneros *Malassezia*, *Cladosporium* y *Mycosphaerella*. Además, se identificó una microbiota compartida entre las semillas de los distintos genotipos analizados, compuesto por cuatro géneros bacterianos (*Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Promicromonospora* y *Acidipropionibacterium*) y tres fúngicos (*Malassezia*, *Cladosporium* y *Mycosphaerella*). La comparación con resultados anteriores de la endosfera de raíces de los mismos árboles, demuestra la presencia de géneros como *Streptomyces* y *Malassezia* en ambas partes de la planta, apuntando a posibles mecanismos de transmisión vertical de microorganismos. Además, se identificó el genotipo del olivo como un factor determinante de la estructura de la comunidad microbiana de la semilla. En general, se encontraron géneros con potenciales funciones beneficiosas para la planta, tales como *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Sphingomonas* y *Cladosporium*.

Como conclusión, los resultados de esta Tesis Doctoral muestran la influencia del manejo agrícola en el microbioma del suelo y de la raíz del olivo, con potenciales implicaciones para la salud de la planta. Los manejos agrícolas menos invasivos, con mayores aportes de materia orgánica, modifican la diversidad y biomasa microbianas y enriquecen la comunidad en géneros potencialmente beneficiosos para la nutrición y crecimiento del olivo, además de mejorar la composición nutricional del suelo y sus redes de coocurrencia. Por otro lado, los resultados aquí descritos no apoyan la

presencia de una microbiota rizosférica diferencial entre genotipos de olivo tolerantes y susceptibles a la verticilosis en condiciones de campo. Por último, destacamos el olivo como una fuente de microorganismos potencialmente beneficiosos para la planta, tanto por los aislados obtenidos de la endosfera radicular, como por la composición bacteriana y fúngica de la microbiota de la semilla. Esta es la primera descripción de la microbiota asociada a semillas de olivo, lo que sienta un precedente para futuros estudios centrados en aislamiento y caracterización de los miembros de su microbioma, así como para programas de mejora genética de la planta.

### SUMMARY

The cultivation of the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) has for millennia been a key element in the nutrition, society, economy and culture of countries located in the Mediterranean Basin. Hence, olive oil production constitutes a very important economic source for many countries, with Spain being the world's largest producer and exporter. However, this crop faces growing threats from a range of biotic and abiotic stresses, interconnected and exacerbated by climate change. Among these stresses, it is worth highlighting the agricultural management of the field. In recent decades, the trend has shifted towards intensive or super-intensive models, characterized by high tree densities ranging from 200 to 2,500 trees/ha, extensive use of phytosanitary products, and increased mechanization of harvesting. This leads to various environmental impacts that affect the flora, fauna and microbial biodiversity, as well as soil health. As a result, ecosystems become less resilient to adverse climatic events (especially relevant in the Mediterranean Basin) and plant pathogens. Moreover, agricultural management has an impact on soil and plant-associated microbial communities, which are closely related to plant health. Hence, there is a rising interest in adopting more sustainable agricultural practices, with a focus on techniques such as the inoculation of plant-beneficial microorganisms and applying farming methods that are less disruptive of the soil and plant microbial communities. With all the above said, the aim of this PhD was to study the root and rhizosphere soil microbiome of olive trees in relation to different stresses, such as agricultural management and verticilosis wilt of

## RESUMEN

---

olive. Moreover, we also delved into less explored sources of microorganisms, including the root endosphere and the olive seed. To achieve this, bacterial isolation was conducted from olive roots and the olive seed microbiome was described for the first time.

First of all, this PhD is based on the use of next-generation sequencing for the characterisation of microbial communities associated with olive tree root system. These sequencing platforms generate large amounts of data that require specialised bioinformatics tools for their analyses. The variety and complexity of these tools, together with the need of specific training, greatly affect the reproducibility of the analyses. To address this, a workflow was developed along with a library of functions in R, combining ease of use and customizable analysis options ([https://nuriawg.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriawg.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)). This workflow has proven valuable not only for data analysis in this PhD, but also for several research articles from international research groups.

In order to investigate the impact of agricultural management on olive root microbial communities, two independent studies were carried out. The first focused on the study of the rhizosphere community of a conventional olive field and an adjacent holm oak forest. The second study evaluated the rhizospheric and endophytic communities of olive trees in nearby orchards with two different agricultural management systems: conventional and organic with sheep manure amendment applied to the soil. The results of both studies demonstrated the influence of agricultural management on microbial communities at different levels. First, a higher soil nutrient content was found in both the holm oak forest and the olive grove under organic management, suggesting that conventional agricultural practices such as ploughing and removal of plant material negatively affect soil nutritional properties. On the other hand, both  $\alpha$ -diversity and  $\beta$ -diversity were different between the agricultural managements studied, both in the rhizosphere and endosphere communities. In addition, the fungal biomass of the rhizosphere was significantly higher in olive trees grown under organic management, which could increase the presence of fungi with beneficial functions for the plant. At the level of taxonomic composition, both the bacterial and fungal community were affected by agricultural management. The olive

orchard soils with the lowest nutrient content exhibited an enrichment of oligotrophic taxa linked to lower soil water content, including *Acidobacteria* and *Gemmatimonadetes*. On these orchards, a higher relative abundance of genera related to herbicide and pesticide degradation was found, such as *Rubrobacter* and *Sphingomonas*. On the other hand, a higher relative abundance of fungal genera related to antimicrobial compound production and plant growth promotion (*Preussia* and *Cladophialophora*) was observed in the organic orchard. Furthermore, organic management was associated with an increase in plant-relevant bacterial metabolic functions, such as nitrogen cycling (*Nitrospira*), degradation of aromatic compounds and defence against pathogens (chitinolysis). Finally, microbial co-occurrence networks showed higher network complexity and lower mean geodesic distance (GD) in the orchard under organic management, which is related to more resilient communities. Our results set a precedent in terms of the olive microbiome, as there are no studies to date in this regard that include bacterial, fungal, endosphere and rhizosphere communities, as well as determination of soil physico-chemical parameters, microbial biomass and co-occurrence network analysis under field conditions.

While agricultural management constitutes an abiotic stress for olive orchards, verticillium wilt of olive (VWO) may be considered as one of the most devastating biotic stresses for this crop. In this PhD, for the first time, we investigated the root microbiota (rhizosphere) of olive trees cultivated under field conditions with differential tolerance to VWO (Frantoio and Picual). According to our results, no clear difference was found between the bacterial and fungal communities in the rhizosphere of both genotypes, which could be related to the agricultural management applied. Future studies will be necessary to elucidate whether differences could be observed in the root endosphere.

One of the objectives of this PhD was to obtain bacterial isolated from less explored microbial sources of olive trees. In this regard, the isolation of microorganisms from the root endosphere was addressed. Due to prior results highlighting the importance of *Actinophytocola* genus in the bacterial community of the olive root endosphere, various methods were used to isolate members of this genus. Although none of these methods were successful for *Actinophytocola*, isolates of other genera with biotechnological interest was achieved, such as *Streptomyces*, *Nocardia*, *Kocuria*,

## RESUMEN

---

*Paenibacillus* and *Rhizobium*. These results constitute the first published isolation of bacteria of these genera from olive endosphere, laying the groundwork for future studies focused on their taxonomic and functional characterisation, along with their potential application as beneficial inoculants for olive cultivation.

Apart from the olive root endosphere, olive seeds constitute a completely unknown source of microorganisms. In this sense, we describe for the first time a procedure for obtaining olive seeds under sterile conditions, as well as the composition of their bacterial and fungal communities. According to our results, the microbiota of olive seed showed unique characteristics compared to other plant species. *Actinobacteria* was the most abundant bacterial phylum, with *Streptomyces* standing out at genus level. *Basidiomycota* and *Ascomycota* were the predominant fungal phyla, represented by genera *Malassezia*, *Cladosporium* and *Mycosphaerella*. In addition, a shared microbiota was identified among the genotypes analysed, consisting of four bacterial genera (*Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Promicromonospora* and *Acidipropionibacterium*) and three fungal genera (*Malassezia*, *Cladosporium* and *Mycosphaerella*). When compared to previous findings from the root endosphere of the same trees, the identification of genera *Streptomyces* and *Malassezia* in both plant compartments suggests potential mechanisms of vertical transmission of microorganisms. In addition, the genotype was identified as a key factor determining the structure of the seed microbial community. Overall, olive tree seeds harboured genera with potential beneficial functions for the plant, such as *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Sphingomonas* and *Cladosporium*.

In conclusion, our results show the influence of agricultural management on the soil and root microbiome of olive trees, with potential implications for plant health. Adopting less invasive agricultural practices with increased organic matter inputs alters microbial diversity and biomass, enhancing the community with genera that could be beneficial for olive nutrition and growth. This also improves the nutritional composition of the soil and its co-occurrence networks. However, our results do not support the presence of a differential rhizosphere microbiota between olive genotypes with different tolerance levels to VWO under field conditions. Lastly, we highlight the olive tree as a source of potentially beneficial microorganisms for the plant, including those

isolated from the root endosphere and the bacterial and fungal components of the seed microbiota. This is the first description of the microbiota associated with olive seeds, which sets a precedent for future studies focused on isolation and characterisation of the members of its microbiome, as well as for plant breeding programmes.



# ÍNDICES



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1. EL AGROECOSISTEMA DEL OLIVAR.....	3
1.1. Historia del cultivo del olivo y su importancia económica y cultural.....	3
1.2. Ciclo biológico del olivo .....	5
1.3. Manejo agrícola del olivar, impacto en el cultivo y en el medio ambiente. ....	7
1.3.1. Evolución del olivar y su manejo agrícola. ....	7
1.3.2. Efectos del manejo agrícola del olivar: hacia alternativas más sostenibles. ....	9
1.4. Estrés bióticos y abióticos a los que se enfrenta el cultivo del olivo y su relación con el manejo agrícola. ....	12
1.4.1. Estrés bióticos.....	12
1.4.2. Estrés abióticos.....	16
2. EL MICROBIOMA DEL OLIVO Y FACTORES QUE LO MODULAN.....	20
2.1. Composición del microbioma del olivo en diferentes tejidos.....	20
2.2. Factores que modulan el microbioma del olivo .....	24
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
M.1. ZONAS DE ESTUDIO .....	35
M.1.1. Mancha Real.....	35
M.1.2. Lupión.....	37
M.1.3. Colección Mundial de Germoplasma de Olivo (WOGC).....	38
M.2. TOMA DE MUESTRAS.....	39
M.2.1. Suelo suelto.....	39
M.2.2. Raíces y suelo rizosférico. ....	39
M.2.3. Semillas .....	40
M.3. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL SUELO Y CONCENTRACIÓN DE FITOSANITARIOS.....	41
M.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	44
M.4.1. Extracción de ADN de suelo .....	44
M.4.2. Extracción de ADN de raíz.....	46

M.4.3. Extracción de ADN de semillas.....	48
M.4.4. Extracción de ADN de cultivo bacteriano.....	48
M.4.5. Amplificación de ADN mediante PCR.....	49
M. 4.5.1. Amplificación de ADN mediante PCR anidada .....	51
M.4.6. Electroforesis de ADN .....	52
M.4.7. Purificación de productos de PCR.....	52
M.4.8. Medida de concentración de ADN .....	54
M.4.9. Secuenciación de ADN .....	54
M.4.9.1 Secuenciación mediante técnica Sanger .....	54
M.4.9.2 Secuenciación masiva con la tecnología MiSeq de Illumina .....	55
M.4.10. Diseño de primers específicos para <i>Actinophytocola</i> y puesta a punto de la PCR .....	57
M.4.11. Clonación de fragmentos de ADN en plásmido y extracción de ADN.....	58
M.4.12. Cuantificación de ADN mediante PCR cuantitativa.....	62
M.4.12.1. Cuantificación de biomasa bacteriana .....	62
M.4.12.2. Cuantificación de biomasa fúngica .....	63
M.4.12.3. Cuantificación de biomasa de arqueas .....	64
M.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO.....	66
M.5.1. Procesamiento de secuencias obtenidas por secuenciación Sanger.....	66
M.5.2. Procesamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva con SEED2.....	68
M.5.3. Procesamiento de secuencias obtenidas por secuenciación masiva con DADA2.....	71
M.5.4. Filtrado de secuencias según una MOCK community y eliminación de secuencias de planta. ....	74
M.5.5. Análisis ecológico de la comunidad microbiana .....	77
M.5.5.1. Diversidad $\alpha$ .....	78
M.5.5.2. Diversidad $\beta$ .....	80
M.5.5.3. Perfiles taxonómicos.....	83
M.5.5.4. Análisis de abundancia diferencial de taxones .....	83
M.5.5.5. Análisis de coordenadas principales (CAP) .....	86
M.5.5.6. Microbioma esencial y accesorio .....	88
M.5.5.7. Predicción de funciones metabólicas mediante FAPROTAX.....	89
M.5.5.8. Análisis de la interacción microbiana por redes de coocurrencia. ....	90
M.6. DESARROLLO DE UNA LIBRERÍA DE FUNCIONES EN R Y TUTORIAL ASOCIADO ...	93
M.6.1. Funciones para el filtrado de secuencias .....	97

M.6.2. Funciones para el análisis de diversidad $\alpha$ .....	98
M.6.3. Funciones para pruebas <i>post-hoc</i> (comparaciones dos a dos).....	100
M.6.4. Funciones para el análisis de diversidad $\beta$ .....	101
M.6.5. Funciones para análisis de abundancias diferenciales.....	102
M.7. OBTENCIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS DE LA ENDOSFERA DEL OLIVO. ....	103
M.7.1. Medios de cultivo y antibióticos .....	103
M.7.2. Aislamientos dirigidos a la obtención de bacterias del género <i>Actinophytocola</i> .....	108
M.7.2.1. Aislamiento a partir de raíces tomadas del WOGC.....	108
M.7.2.2. Enriquecimiento mediante desecación de las raíces de olivo con cloroformo .....	109
M.7.2.3. Pretratamientos y siembra con filtros de nitrocelulosa.....	111
M.7.2.4. Crecimiento oligotrófico .....	114
M.7.2.5. <i>Screening</i> masivo mediante PCR.....	114
M.7.2.6. Aislamiento desde raíces del cultivar Picual .....	115
M.7.2.7. Aislamiento a partir de raíces preenriquecidas .....	116
M.7.3. Experimentos de planta trampa .....	118

**CAPÍTULO I: Micro4all: desarrollo de una librería en R y tutorial asociado para el análisis de datos de amplicones bacterianos y fúngicos.**  
 ..... 125

I.1. INTRODUCCIÓN .....	125
I.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	129
I.3. RESULTADOS.....	129
I.3.1. Instalación de Micro4all y lectura de archivos. ....	130
I.3.2. Evaluación de la calidad de secuenciación.....	131
I.3.3. Selección de los parámetros de corte con la herramienta FIGARO. ....	134
I.3.4. Eliminación de primers con la herramienta CUTADAPT.....	135
I.3.5. Flujo de trabajo de DADA2.....	136
I.3.6. Clasificación taxonómica y obtención de tabla de ASVs. ....	138
I.3.7. Análisis de la comunidad MOCK y eliminación de secuencias de planta. ...	139
I.3.8. Preparación de los datos para análisis de ecología microbiana.....	142
I.3.9. Análisis de diversidad $\alpha$ . ....	142
I.3.10. Análisis de diversidad $\beta$ . ....	146

I.3.11. Generación de tablas con abundancia relativa y representación gráfica del perfil taxonómico. ....	151
I.3.12. Análisis de abundancia diferencial de taxones con ANCOM-BC. ....	153
I.3.13. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP). ....	155
I.3. DISCUSIÓN .....	157
<b>CAPÍTULO II: Estudio comparativo de comunidades microbianas de encina y olivo sometidas a diferentes manejos del suelo. ....</b>	<b>165</b>
II.1. INTRODUCCIÓN .....	165
II.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	169
II.3. RESULTADOS.....	171
II.3.1. Calidad de la secuenciación de los amplicones del gen <i>16S rRNA</i> y la región intergénica ITS2 .....	171
II.3.2. Evaluación de la diversidad bacteriana en el suelo suelto y rizosférico de olivo y encina. ....	172
II.3.3. Estimación de la diversidad fúngica en el suelo suelto y rizosférico de olivo y encina .....	174
II.3.4. Diferencias en la composición de las comunidades bacterianas .....	175
II.3.5. Diferencias en la composición de las comunidades fúngicas.....	178
II.3.6. Microbioma esencial .....	180
II.3.7. Influencia de las propiedades del suelo en las comunidades microbianas	182
II.4. DISCUSIÓN .....	187
<b>CAPÍTULO III: Biodiversidad del olivar: la influencia de la agricultura ecológica en las comunidades microbianas. ....</b>	<b>195</b>
III.1. INTRODUCCIÓN .....	195
III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	198
III.3. RESULTADOS.....	199
III.3.1. Efecto del manejo agrícola en el suelo: parámetros fisicoquímicos y biomasa microbiana.....	199
III.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo.....	199
III.3.1.2. Biomasa microbiana de la rizosfera. ....	201
III.3.2. Características generales de los datos de secuenciación.....	202

III.3.3. La enmienda de estiércol de oveja afectó diferencialmente a las comunidades bacterianas y fúngicas. ....	202
III.3.4. Influencia del manejo del suelo en el perfil taxonómico de la rizosfera de olivo.....	206
III.3.5. <i>Actinobacteria</i> y <i>Ascomycota</i> : taxones principales en el perfil taxonómico de la endosfera.....	210
III.3.6. Grupos funcionales fúngicos. ....	211
III.3.7. Inferencia de funciones metabólicas.....	213
III.3.8. Efectos opuestos del manejo del suelo en las redes de coocurrencia en ambos compartimentos. ....	218
III.4. DISCUSIÓN .....	219
<b>CAPÍTULO IV: EL MICROBIOMA DE LA SEMILLA DE OLIVO.....</b>	<b>231</b>
IV.1. INTRODUCCIÓN .....	231
IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	234
IV.3. RESULTADOS .....	236
IV.3.1. Características generales de datos de secuenciación. ....	236
IV.3.2. El genotipo determina la diversidad y la estructura de las comunidades microbianas. ....	238
IV.3.3. El agrupamiento genético influye en la comunidad bacteriana de las semillas. ....	241
IV.3.4. Primera descripción del microbioma de las semillas de olivo: composición y microbioma compartido.....	242
IV.3.5. Identificación de ASVs presentes tanto en la semilla como en la endosfera de la raíz del olivo.....	244
IV.4. DISCUSIÓN .....	246
<b>CAPÍTULO V. Aislamiento e identificación de bacterias colonizadoras de la endosfera de olivo.....</b>	<b>255</b>
V.1. INTRODUCCIÓN .....	255
V.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	257
V.3. RESULTADOS .....	260
V.3.1. Aislamiento a partir de raíces tomadas de la WOGC.....	260
V.3.2. Desecación con cloroformo. ....	261

## ÍNDICES

---

V.3.3. Tratamientos, siembra con filtros de nitrocelulosa y crecimiento oligotrófico.	262
V.3.4. <i>Screening</i> masivo mediante PCR	262
V.3.5. Aislamiento desde raíces de Picual	263
V.3.6. Aislamiento a partir de raíces pre-enriquecidas	264
V.3.7. Experimentos de planta trampa	264
V.3.8. Almacenamiento y caracterización de aislados de interés	264
V.4. DISCUSIÓN	273
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>281</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>295</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>299</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Países del mundo donde se cultiva el olivo.	4
Figura 1.2. Estructura del fruto del olivo.	7
Figura 1.3. Cultivos de olivo.	8
Figura 1.4. Síntomas de la verticilosis del olivo.	15
Figura M1. Esquema sobre la composicionalidad de los datos de metataxonomía.	86
Figura I.1. Histograma donde se muestran el número de lecturas brutas según la longitud de las mismas.	132
Figura I.2. Gráfico de evolución del índice de calidad de la secuencia.	134
Figura I.3. Gráfico de la frecuencia de error para cada posible transición/transversión de nucleótidos.	137
Figura I.4. Gráficos de diversidad $\alpha$ .	144
Figura I.5. Gráficos de diversidad $\beta$ .	150
Figura I.6. Perfil bacteriano a nivel de género.	153

Figura I.7. Gráficos de abundancias diferenciales entre taxones.....	155
Figura I.8. Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP) sobre muestras de endosfera de <i>Pinus pinaster</i> .....	157
Figura II.1. Índices de diversidad $\alpha$ (A) bacteriana y (B) fúngica de cada tratamiento.....	173
Figura II.2. Gráficos de ordenación de las comunidades bacterianas y fúngicas. ....	174
Figura II.3. Perfiles taxonómicos microbianos de suelos y rizosfera. ....	177
Figura II.4. Géneros bacterianos cuya abundancia relativa difirió de manera estadísticamente significativa y biológicamente relevante entre grupos. ....	178
Figura II.5. Géneros fúngicos cuya abundancia relativa difirió de manera significativa y biológicamente relevante entre grupos. ....	180
Figura II.6. Diagramas de Venn para los géneros del bacterioma esencial y específico de cada condición bajo estudio.....	181
Figura II.7. Diagramas de Venn para los géneros del microbioma esencial y específico de cada condición bajo estudio.....	182
Figura II.8. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP). ....	184
Figura III.1. Biomasa bacteriana y fúngica en la rizosfera .....	201
Figura III.2. Índices de diversidad $\alpha$ para la comunidad bacteriana (paneles A y B) y fúngica (paneles C y D) en cada tratamiento y microhábitat (paneles A y C, rizosfera; B y D, endosfera radicular). ....	203
Figura III.3. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de la comunidad microbiana.....	205
Figura III.4. Perfil de composición bacteriana en la rizosfera y endosfera radicular. ....	207
Figura III.5. Perfil de composición fúngica en la rizosfera y endosfera radicular. ....	209
Figura III.6. Resultado de FungalTraits para rizosfera y endosfera. ....	212

## ÍNDICES

---

Figura IV.1. Índices de diversidad $\alpha$ bacteriana (A) y fúngica (B) para cada genotipo de olivo.....	239
Figura IV.2. Análisis de coordenadas principales de las comunidades bacteriana (A) y fúngica (B). .....	240
Figura IV.3. Perfiles taxonómicos bacterianos (A, B) y fúngicos (C, D) de semillas de diferentes genotipos de olivo.....	243
Figura IV.4. Géneros presentes en las semillas y en la endosfera radicular de los mismos genotipos.....	245
Figura V.1. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como <i>Streptomyces</i> spp. ....	267
Figura V.2. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como <i>Kocuria</i> spp. ....	268
Figura V.3. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como <i>Nocardia</i> spp.....	270
Figura V.4. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como <i>Paenibacillus</i> spp. ....	271
Figura V.5. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como <i>Rhizobium</i> spp. ....	272

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla M1. Se muestran las diferentes zonas de muestreo, los acrónimos usados y su localización con coordenadas GPS. ....	36
Tabla M2. Parámetros fisicoquímicos y productos fitosanitarios medidos en las diferentes fincas de muestreo.....	42
Tabla M3. Primers usados para la amplificación del gen <i>16S rRNA</i> mediante PCR. ....	50

Tabla M4. Se muestra la composición de la comunidad sintética utilizada en los ensayos de secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq.....	75
Tabla M5. Tabla de ejemplo de la entrada de datos para las funciones del paquete Micro4all centradas en el análisis de diversidad $\alpha$ .....	98
Tabla I.1. Ejemplo de la tabla con los valores de los índices de diversidad, riqueza y equidad obtenida según lo indicado en el flujo de trabajo de Micro4all.....	145
Tabla I.2. Valores de p de las diferentes pruebas estadísticas realizadas sobre los índices de diversidad $\alpha$ comparados entre las diferentes localizaciones analizadas en el tutorial del paquete Micro4all.....	146
Tabla I.3. Se muestran los resultados del análisis de diversidad $\beta$ entre las diferentes localizaciones analizadas en el tutorial del paquete Micro4all. ....	148
Tabla II.1. Características fisicoquímicas del suelo presentadas como media y desviación estándar.....	183
Tabla II.2. Géneros bacterianos y fúngicos con un índice de correlación con parámetros fisicoquímicos mayor al 0,6. ....	185
Tabla III.1. Propiedades físicoquímicas del suelo. ....	200
Tabla III.2. Valores de p obtenidos en el análisis de diversidad $\beta$ . ....	204
Tabla III.3. Potenciales funciones metabólicas predichas por FAPROTAX en la rizosfera.....	214
Tabla III.4. Potenciales funciones metabólicas predichas por FAPROTAX en la endosfera radicular.....	216
Tabla III.5. Principales propiedades topológicas de las redes de coocurrencia. ....	219
Tabla IV.1. Detalles sobre los genotipos muestreados, así como número de muestras finales utilizadas en el análisis de datos de microbioma bacteriano y fúngico. ....	237
Tabla IV.2. Comparaciones estadísticas de los índices de diversidad $\alpha$ basadas en pruebas de Kruskal-Wallis entre genotipos.....	239

## ÍNDICES

---

Tabla IV.3. Comparaciones estadísticas de los índices de diversidad  $\beta$  basadas en disimilitudes Bray-Curtis..... 240

Tabla IV.4. Comparaciones dos a dos de una prueba de PERMANOVA sobre disimilitudes Bray-Curtis de las comunidades bacterianas y fúngicas entre diferentes agrupamientos genéticos. .... 241

Tabla V.1. Se muestra el número de aislados obtenidos a partir de la endosfera de raíz de olivo y su clasificación a nivel de género ..... 261

Tabla V.2. Se muestra el número de aislados obtenidos a partir de la endosfera de raíz de olivos del genotipo Picual ..... 263

## LISTA DE ABREVIATURAS

GD - Distancia geodésica media (del inglés, Geodesic Distance)

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AR - Arbequina

ASV - Amplicon Sequence Variant

BA - Barnea

CAP - Canonical Analysis of Principal coordinates

CM - Olivar bajo manejo convencional (del inglés, Conventional Management)

CNP - Cáñar Pinar

CNR - Cáñar Reforestación

CPU - Unidad Central de Procesamiento (del inglés, Central Processor Unit)

FR - Frantoio

GA - Glicerol Arginina Agar

GUI - Interfaz Gráfica de Usuario (del inglés, Graphic User Interface)

HH - Medio de cultivo Hagedorn-Holt

HOR - Suelo rizosférico de encinar (del inglés, Holm Oak Rhizosphere)

HOB - Suelo suelto de encinar (del inglés Holm Oak Bulk)

IFAPA - Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica

JA - Jaén

KA - Kalinjot

KO - Koroneiki

LB - Medio de cultivo Luria-Bertani

MAG - Metagenome Assembled Genomes

ME - Menorca

NA - Agar nutritivo (del inglés, Nutrient Agar)

NMDS - Non-metric multidimensional scaling

OLB - Suelo rizosférico de olivar (del inglés, Olive Tree Rhizosphere)

OLR - Suelo suelto de olivar (del inglés, Olive Tree Bulk)

OM - Olivar bajo manejo orgánico (del inglés, Organic Management)

OTU - Unidad Taxonómica Operativa (del inglés, Operative Taxonomic Unit)

PCR - Polymerase Chain Reaction

PEP - Porcentaje de Enlaces Positivos

PGPB - Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (del inglés, Plant Growth Promoting Bacteria)

PGPM - Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (del inglés, Plant Growth Promoting Microorganisms)

PI - Picual

## ÍNDICES

---

PNA - Ácido Peptidonucleico (del inglés, Peptide Nucleic Acid)

RAPD - perfiles genéticos RAPD (del inglés, Randomly Amplified Polymorphic DNA)

SCA - Medio de cultivo Starch Casein Agar

TAE - Tampón Tris Acetato y EDTA

TMM - Trimmed Mean of Means

TSA - Medio de cultivo Tryptic Soy Agar

TSB - Medio de cultivo Tryptic Soy Broth

TY - Triptone-Yeast

US - Uslu

VIF - Inflación de la Varianza (del inglés, Variance Inflation Factor)

VV - Verde Verdelho

VWO - Verticilosis del Olivo (del inglés, Verticillium Wilt of Olive)

WA - Medio de cultivo Water Agar

WAC - Medio Water Agar con extracto crudo de raíz

WAF - Medio Water Agar con extracto filtrado de raíz

WOGC - World Olive Germplasm Collection

# **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### 1. El agroecosistema del olivar.

#### 1.1. Historia del cultivo del olivo y su importancia económica y cultural.

El olivo es considerado como uno de los primeros árboles cultivados en la Cuenca Mediterránea. Si bien se encuentran evidencias arqueológicas datadas del Pleistoceno medio o bajo Paleolítico que incluyen semillas de olivo, madera y polen de 780.000 años de antigüedad, los estudios apuntan a que su cultivo no comenzó hasta el Neolítico (Langgut et al., 2019). En este sentido, Zohary y Spiegel-Roy (1975), propusieron que el olivo comenzó a ser utilizado en agricultura durante el Calcolítico (alrededor del 3.700 al 3.500 a. C.) en el valle del Jordán (Zohary & Spiegel-Roy, 1975). Otros autores han propuesto que su cultivo comenzó un milenio más tarde durante la temprana Edad del Bronce e incluyendo otras regiones dentro del Levante Meridional (Kaniewski et al., 2012; Liphshitz et al., 1991). Sin embargo, un estudio reciente de Langgut y colaboradores (2019), aborda esta cuestión mediante la integración de datos de polen fósil con información arqueológica y arqueobotánica. En este sentido, se produce un aumento consistente del polen de olivo, junto con la aparición de evidencia arqueológica y arqueobotánica, alrededor del 4.500 a. C. Este aumento no se ve acompañado de un incremento de polen de otras especies con necesidades ambientales similares, lo que permite descartar la influencia de un evento climático en su expansión.

A pesar de estas discrepancias entre autores, parece claro que el olivo ha formado parte de las civilizaciones de la Cuenca Mediterránea desde hace miles de años. Su importancia cultural queda reflejada por su presencia en textos sagrados como la Biblia Hebrea, Cristiana y en el Corán (Kaniewski et al., 2012), así como por su aparición en la mitología (la diosa Atenea consideró el olivo como el mejor regalo para la ciudad de Atenas) o por su presencia en el collar floral enterrado en la tumba de Tutankamón (Fernández Gutiérrez & Segura Carretero, 2009; Kaniewski et al., 2012; The Metropolitan Museum of Art, 2023).

## INTRODUCCIÓN

---

A día de hoy, la importancia del cultivo del olivo sigue patente por la gran extensión agrícola que ocupa, así como por su impacto en la economía asociado a la producción y exportación de su preciado aceite. Según los datos de la FAO (*The Food and Agriculture Organization*), el olivo es cultivado en 41 países diferentes, con un área cosechada de 10.338.495 hectáreas (datos del 2021, Figura 1.1.).



**Figura 1.1. Países del mundo donde se cultiva el olivo.** La intensidad del color indica las toneladas de aceituna producidas en 2021. Datos tomados de FAOSTAT 2021.

Cabe destacar que, solo en España, se acumula el 25 % de las hectáreas mundiales dedicadas a la cosecha de aceituna, lo que supone 2.623.390 hectáreas en el año 2021. Esta cifra supera en un 51 % al segundo productor mundial, Túnez. En cuanto a la producción de aceite, se calcula que España produce el 40 % de las toneladas mundiales de aceite de oliva, superando en un 72 % al segundo productor mundial, Italia. Dentro de España, Andalucía es, indudablemente, la región donde se concentra esta industria, suponiendo el 62 % de la extensión agrícola del olivar de España y el 16 % de la extensión global. Sin embargo, el cultivo del olivo no solo supone un factor importante a nivel económico en Andalucía, sino también a nivel social, cultural y de estructuración territorial. Al ser el principal sustento económico de muchas zonas

rurales de Andalucía, tiene una gran importancia en el mantenimiento de la población en estas zonas, así como en la preservación de su paisaje, biodiversidad y patrimonio cultural. En este sentido, la despoblación de las zonas rurales es un tema de creciente preocupación en Europa ante el avance de la globalización y del desarrollo tecnológico. Factores como la concentración de la oferta laboral en las urbes así como la industrialización de la agricultura, entre otros, reducen las posibilidades de desarrollo económico en el medio rural. Los grandes avances tecnológicos de nuestros tiempos suponen indudables beneficios a la sociedad, pero no debemos olvidar que el primer sustento del ser humano sigue siendo la alimentación, que junto con la cohesión social y el entorno natural, constituyen factores extremadamente dependientes del cuidado del medio rural (European Commission, 2021; Fernández Gutiérrez & Segura Carretero, 2009).

### **1.2. Ciclo biológico del olivo**

Dentro del ciclo biológico del olivo, se pueden distinguir dos grandes fenómenos: el crecimiento de los brotes o crecimiento vegetativo y el desarrollo de los frutos o ciclo reproductivo. Si bien ambos fenómenos son cíclicos, el desarrollo del fruto requiere de dos estaciones consecutivas. Esto se conoce como alternancia o vecería del olivar, dando lugar a la sucesión de años con cosechas abundantes (años de carga) y con cosechas escasas o nulas (año de descarga). El crecimiento vegetativo más importante del olivo se da al comienzo de la primavera, correspondiendo con final de marzo en el hemisferio norte. Esta fase se prolonga hasta la mitad de julio aproximadamente. Entre septiembre y octubre, si se dan lluvias o si el cultivo es de regadío, se puede dar un segundo flujo de crecimiento vegetativo (Barranco et al., 2017; R. S. Lucas, 2019).

En cuanto al ciclo reproductivo del olivar, este comienza con la aparición, poco después del comienzo del crecimiento vegetativo, de yemas axilares, localizadas en las axilas de las hojas de los brotes en crecimiento. En las seis semanas de desarrollo de las yemas, el destino reproductivo o vegetativo de las mismas dependerá de si se da o no la inducción floral. Esta inducción floral depende de la cosecha de ese año. De esta manera, habrá una menor inducción floral de las yemas en los años de carga (con

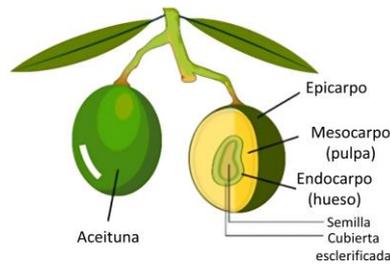
## INTRODUCCIÓN

---

elevada cosecha), mientras que la inducción floral será alta en años donde la producción de fruto es baja (años de descarga), determinando el fenómeno de alternancia o vecería del olivar (Barranco et al., 2017; Benlloch-González et al., 2018; Rosati et al., 2010). Así, una vez formadas las yemas, estas permanecerán en latencia hasta el año siguiente, cuando comience el desarrollo floral. En las condiciones climáticas de Andalucía, la floración se da aproximadamente en mayo, si bien existen variaciones que vienen principalmente determinadas por las temperaturas experimentadas en los meses anteriores. Por ejemplo, temperaturas elevadas en marzo y abril adelantan la floración (Benlloch-González et al., 2018; R. S. Lucas, 2019). Durante la floración, ocurre la polinización y fecundación de la flor. Para ello, el polen debe pasar desde la antera al estigma de la flor (ya sea de la misma o de otra flor) y formar el tubo polínico, que debe alcanzar el saco embrionario para que se fecunde la ovocélula. En este respecto, el olivo es mayormente autoincompatible, dándose una serie de mecanismos que dificultan la llegada del polen del mismo genotipo de olivo al saco embrionario, favoreciendo así la polinización cruzada (Barranco et al., 2017).

Una vez ocurre la fecundación, comienza el desarrollo del endospermo. Con la formación de los primeros frutos, se da una competencia por los recursos de la planta (fotoasimilados) entre estos y los ovarios de flores sin fecundar, dando lugar a la caída de un alto porcentaje de flores, lo que se conoce como abscisión (Barranco et al., 2017). Esto determina el número de frutos finales que seguirán desarrollándose hasta la formación del fruto final. La primera fase de crecimiento del fruto se ve dominada por el engrosamiento del endocarpo. Después de unas 7 a 9 semanas de la floración, se da el endurecimiento del mismo y alcanza su tamaño final. A esto le sucede un período de latencia, que coincide con el período estival, donde el fruto apenas experimenta crecimiento, seguido de una fase final de crecimiento a principios de otoño, donde el mesocarpo aumenta su tamaño y contenido lipídico. Finalmente, el enverado o cambio de color de la epidermis de la aceituna indica el comienzo de los procesos de maduración

del fruto (Barranco et al., 2017; R. S. Lucas, 2019; Zafra et al., 2018). La estructura de la aceituna y de la semilla se puede observar en la Figura 1.2 (Valvez et al., 2021).



**Figura 1.2. Estructura del fruto del olivo.** Se muestran los tejidos que conforman la parte comestible de la aceituna, así como la semilla. Figura adaptada de Valvez y colaboradores (2021).

### **1.3. Manejo agrícola del olivar, impacto en el cultivo y en el medio ambiente.**

#### **1.3.1. Evolución del olivar y su manejo agrícola.**

En las últimas décadas, el cultivo del olivo ha sufrido drásticos cambios en el manejo agrícola aplicado, pasando de un manejo tradicional a un manejo intensivo e industrializado (Figura 1.3). La tendencia que se ha ido adoptando implica el uso de cultivos intensivos (200-450 árboles/ha) y súper intensivos (1.000-2.500 árboles/ha) con irrigación (Morgado, 2022). En estos sistemas, especialmente en los súper intensivos, se está expandiendo el uso de variedades enanas de olivo (de genotipos como Arbequina o Arbosana), que permiten el cultivo en seto, lo que facilita la mecanización de la recolección. Además, estos genotipos presentan un período juvenil más corto hasta la producción de fruto (Connor et al., 2014). La implementación de este tipo de prácticas se ve asociada con un mayor uso de productos fitosanitarios, incluyendo pesticidas y fertilizantes (Guerrero-Casado et al., 2021; Romero-Gómez et al., 2017). En este sentido, los cultivos súper intensivos con más de 1.000 árboles/ha aumentaron en un 65 % en el territorio español entre los años 2015 y 2019 (Servicio de Estudios y Estadísticas, 2019). Por su parte, Guzmán y colaboradores (2022) también han descrito un creciente

## INTRODUCCIÓN

---

aumento en la tierra dedicada a este tipo de cultivos. En su estudio, evalúan la extensión de cultivos intensivos de olivo en tierras tradicionalmente destinadas al crecimiento de cereales en la campiña cordobesa. Sus resultados mostraron que los cultivos intensivos se duplicaron en esta región en un período de 13 años (desde 2005 hasta 2018), con una tendencia a una mayor densidad arbórea y una mayor frecuencia de irrigación. La evolución en el manejo agrícola del olivar trae consigo consecuencias para el medio ambiente y el desarrollo rural de las regiones productoras, que serán abordadas en más detalle en las siguientes secciones.



**Figura 1.3. Cultivos de olivo.** En la figura A se observa un cultivo extensivo, con baja densidad arbórea, árboles longevos y cubierta vegetal localizado en Órgiva, Granada. En la figura B se observa un cultivo súper intensivo de la localidad Antequera, Málaga. Imágenes tomadas por el Doctor Manuel Fernández López.

### **1.3.2. Efectos del manejo agrícola del olivar: hacia alternativas más sostenibles.**

La influencia del manejo agrícola del olivar en el medio ambiente y en la sociedad varía notablemente según las prácticas agrícolas implementadas (Guerrero-Casado et al., 2021). En este sentido, los cultivos intensivos y súper intensivos tienen un impacto importante sobre la biodiversidad asociada al olivar por diversos motivos. Por un lado, se suelen utilizar genotipos de olivo de menor porte y edad, resistentes a una poda agresiva, los cuales poseen una estructura en su tronco menos compleja, en contraposición a los olivos de mayor porte que se encuentran en cultivos tradicionales. Esta estructura, que incluye múltiples cavidades, proporciona refugio y nido para una gran variedad de especies, incluyendo artrópodos, reptiles y aves (Guerrero-Casado et al., 2021). De hecho, Vasconcelos y colaboradores (2022) demostraron recientemente que la intensificación del olivar, acompañada de un menor uso de cubiertas vegetales, producía una disminución en la abundancia de artrópodos del dosel arbóreo. Morgado y colaboradores (2020) demostraron que las aves insectívoras eran las más afectadas por el cambio a sistemas súper intensivos. Ante la disminución de los hábitats naturales, el agroecosistema del olivar constituye una fuente de alimentación y refugio para estas y otras aves. Sin embargo, la homogenización del paisaje agrícola en cuanto a los cultivares de olivo usados y a la ausencia de otras especies vegetales, así como la reducción de artrópodos por el uso de pesticidas, dificulta la adaptación de estas aves al entorno. Además, este tipo de cultivos, por su alta mecanización, deben ser desarrollados en tierras arables, sustituyendo a otros cultivos, como cereales, que constituyen el hábitat de aves de cultivos de bajo porte y esteparias (Guerrero-Casado et al., 2021; Moreno Montesino J & Muñoz-cobo J, 2003, 2003; Rey, 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que el uso de agroquímicos por área en este tipo de cultivos es considerablemente mayor. Así, Romero-Gámez y colaboradores (2017) describieron que en cultivos súper intensivos se aplicaban más del doble de fertilizantes nitrogenados por hectárea en comparación a cultivos tradicionales (Romero-Gámez et al., 2017). El uso de productos fitosanitarios genera una serie de impactos medioambientales y en la biodiversidad que deben tenerse en cuenta. En

## INTRODUCCIÓN

---

cuanto a los efectos de los fertilizantes químicos, estos influyen directamente en el contenido de nutrientes del suelo, lo que también ejerce un impacto sobre las comunidades microbianas del mismo (T. Wu et al., 2008). Además, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados conlleva la emisión de gases de efecto invernadero como el  $N_2O$ . De hecho, se estima que la agricultura es la principal fuente antropogénica de este gas, cuyas emisiones han ido en aumento y se predice que continúen con esta tendencia (Gu et al., 2021; Reay et al., 2012; X. Zhang et al., 2015). Esto no solo tiene un impacto en el medio ambiente en cuanto a calentamiento global, sino también en la salud humana. Así, las especies reactivas de nitrógeno asociadas a estas emisiones agravan la contaminación atmosférica, problema que causa millones de muertes cada año (Gu et al., 2021; Jayaraj et al., 2017). En relación a esto, los pesticidas también han sido asociados a la aparición de múltiples enfermedades según la evaluación de la evidencia científica existente por el panel de expertos del Instituto Nacional de Investigación en Salud y Medicina de Francia (Inserm, 2021). En cuanto a los efectos en la biodiversidad, tanto el uso de fertilizantes nitrogenados como de pesticidas ha demostrado tener un efecto perjudicial sobre la diversidad de plantas e invertebrados (Beketov et al., 2013; Nessel et al., 2021; Stehle & Schulz, 2015; Stokstad, 2021; Suding et al., 2005). Además, se ha demostrado cómo los pesticidas pueden afectar a la diversidad microbiana del suelo debido a la alteración de rutas metabólicas, viéndose una asociación entre el uso de ciertos pesticidas y la disminución de la nitrificación bacteriana cuantificada según los niveles de expresión de genes implicados en dicha ruta (Banerjee & van der Heijden, 2022; Jacobsen & Hjelmsø, 2014). En este sentido, un estudio reciente de Edlinger y colaboradores (2022) apunta a una reducción de la riqueza de hongos micorrícicos arbusculares y de su capacidad de tomar fósforo del suelo tras la aplicación de diferentes fungicidas (Edlinger et al., 2022). De esta manera, no resulta extraño que la Comisión Europea haya emitido un informe donde se plantea el objetivo de eliminar al completo los pesticidas de síntesis para el año 2035 (European Parliamentary Research Service, 2025).

Otro de los efectos que puede tener este tipo de manejo del cultivo del olivar sobre el medioambiente se relaciona con el uso del agua. La disponibilidad de agua para el cultivo se ve comprometida en dos sentidos. Por una parte, se genera un aumento en

el consumo de agua ya que los cultivos tradicionales, de secano, se ven sustituidos por cultivos irrigados y, al tener una alta densidad arbórea, requieren una mayor cantidad de agua por hectárea, generando un mayor consumo de las reservas de agua de la zona (Guerrero-Casado et al., 2021; Guzmán et al., 2022). Esto es algo especialmente preocupante para las regiones Mediterráneas, donde a la tradicional sequía estival hay que sumar la escasez de agua por los crecientes fenómenos de sequía asociados al cambio climático, lo que hace que se esté convirtiendo en un problema persistente a lo largo de todo el año (United Nations, 2020).

Otra de las principales preocupaciones relacionadas con la intensificación de la agricultura es la degradación del suelo. La degradación del suelo es la pérdida de calidad del mismo tanto a nivel físico, químico como biológico, que lleva a la reducción parcial o total de los servicios ecosistémicos proporcionados por el mismo. Esta degradación puede incluir tanto la pérdida de materia orgánica, cambios en la estructura del suelo, erosión, cambios en la salinidad o disminución de la fertilidad, entre otros (Ferreira et al., 2022). Así, se calcula que del 60 al 70 % del suelo europeo se encuentra degradado o en proceso de degradación, hecho debido principalmente al manejo agrícola aplicado (European Commission, 2023; Ferreira et al., 2022). Dentro de Europa, la Cuenca Mediterránea es una zona especialmente vulnerable y se ha descrito como la región de Europa con mayor tasa de erosión (Ferreira et al., 2022; García-Ruiz et al., 2013). Esto es especialmente preocupante por el papel crucial del suelo en la agricultura, no sólo por constituir el sustrato en el que se asientan los cultivos, sino también porque proporciona diversos servicios ecosistémicos relacionados con (i) la fertilidad, asegurando la nutrición vegetal y su crecimiento, (ii) filtrado del agua y reservorio de la misma para las plantas, lo que influye en la mitigación de inundaciones, (iii) regulación climática, al secuestrar carbono y regular la emisión de gases de efecto invernadero (iv) conservación de la biodiversidad, al ser el hábitat para miles de especies, lo que puede influir, por ejemplo, en el control de plagas y (v) fuente de materiales como turba y arcilla (Dominati et al., 2010). En esta línea, Vanwalleghem y colaboradores (2011), modelaron las tasas de erosión del suelo de cultivos de olivo con datos a lo largo de 250 años y observaron que, a una mayor intensificación agrícola, la erosión del suelo también fue mayor, encontrando el valor mínimo de erosión en un período donde se encontró un mayor uso

de rotación con cereales (Vanwalleghem et al., 2011). Otras de las prácticas que contribuyen a la erosión del suelo es la eliminación de cubiertas vegetales. El uso de cubiertas vegetales aporta protección física al suelo, al reducir la incidencia de los rayos solares así como el impacto de la lluvia, al tiempo que favorece la infiltración de agua y mejora la estructura del mismo (Adetunji et al., 2020). De hecho, en el caso del olivar se ha demostrado en condiciones de campo que el uso de cubierta vegetal es una de las prácticas que más reducen la pérdida de suelo (Rodríguez Sousa et al., 2023; Sastre et al., 2017).

Por otro lado, las consecuencias de la intensificación de la agricultura también llegan al ámbito social. Como se explicó en el apartado anterior, el cultivo del olivo supone el sustento para numerosas familias de entornos rurales, evitando así el abandono rural y la pérdida cultural y de patrimonio asociada. En este sentido, la industrialización de la agricultura supone una alta inversión inicial que no es accesible a este tipo de economías, siendo relegado a grandes corporaciones. Por otro lado, este tipo de manejo requiere una menor mano de obra, conllevando pérdidas de empleo (Guerrero-Casado et al., 2021; Morgado, 2022).

Es por estas razones que resulta crucial promover sistemas de manejo agrícola del olivar que sean más sostenibles. En este sentido, el olivar presenta un gran potencial debido a su naturaleza leñosa y su longevidad, pudiendo almacenar mucho más CO<sub>2</sub> y a más largo plazo que otro tipo de cultivos (Galán-Martín et al., 2022). Además, la integración del uso de cubiertas vegetales aumentaría el almacenaje de CO<sub>2</sub>, gracias al mayor almacenamiento de carbono en el suelo, tanto por el carbono aportado por la planta como por un menor arado del mismo (Castro et al., 2008; Márquez-García et al., 2024; Romero-Gámez et al., 2017; Vicente-Vicente et al., 2017).

### **1.4. Estrés bióticos y abióticos a los que se enfrenta el cultivo del olivo y su relación con el manejo agrícola.**

#### **1.4.1. Estrés bióticos.**

Existen numerosos estrés bióticos a los que puede verse sometido el cultivo del olivo, incluyendo plagas de invertebrados fitófagos, ataques de nemátodos y

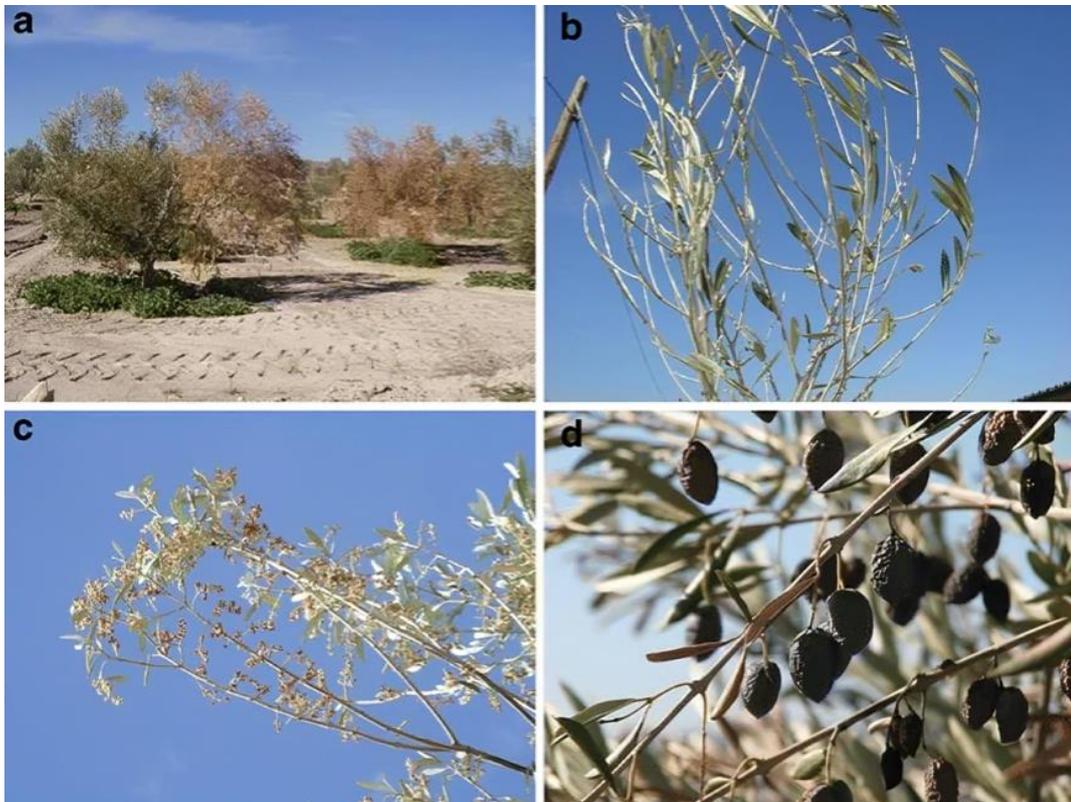
enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenos. Si bien existen más de cien especies fitófagas que afectan al olivo, tres son las principales plagas que afectan al olivar en Europa en términos de pérdidas económicas. Estas son la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), la polilla del olivo (*Prays oleae*) y la cochinilla del olivo (*Saissetia oleae*). En cuanto a las enfermedades causadas por microorganismos, los agentes causantes también incluyen cientos de especies, si bien podríamos destacar las enfermedades más devastadoras para el olivar. Estas se corresponden con la verticilosis del olivo, causada por el hongo vascular *Verticillium dahliae*, el síndrome del decaimiento rápido del olivo, causado por la bacteria *Xylella fastidiosa*, y, por último, una serie de afecciones fúngicas y bacterianas de hojas y frutos, como el repilo del olivo (*Fusicladium oleagineum*), la antracnosis causada por especies del género *Colletotrichum*, el emplomado del olivo (*Pseudocercospora cladosporioides*) y la tuberculosis del olivo, producida por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (EIP-AGRI Focus Group, 2020).

Entre las plagas y enfermedades mencionadas, la verticilosis del olivo es considerada como una de las más problemáticas para el olivar (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). En España se estima que la incidencia media es del 0,4 %, alcanzando valores del 9 % y hasta del 50 % en ciertas regiones (Cardoni, 2023). Por otro lado, el rendimiento del cultivo se ve gravemente afectado, con algunas estimaciones llegando al 89 % de pérdidas de productividad en árboles jóvenes del cultivar Picual (Levin et al., 2003). En Siria se ha documentado una pérdida del 0,9 al 4,5 % en la recolección de aceituna asociado a una incidencia del 1 al 2,3 % (Al-Ahmad & Mosli, 1993). La enfermedad es de tipo vascular y es producida por el hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* Kleb. Este hongo hemibiotrófico del suelo presenta una reproducción estrictamente asexual, con la producción de una serie de estructuras implicadas en su transmisión y perdurabilidad en el suelo (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011; Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). Así, durante la fase necrótica es capaz de producir unas estructuras altamente resistentes conocidas como microesclerocios, las cuales se estima que pueden perdurar en el suelo durante 14 años (Klosterman et al., 2009), pudiendo ser reactivados ante la presencia de exudados radiculares del olivo (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). Además, tienen la

## INTRODUCCIÓN

---

capacidad de propagarse en el agua de regadío, en la de lluvia, así como en maquinaria y herramientas agrícolas (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). Una vez se da la germinación del hongo, las hifas penetran en las raíces de manera pasiva, a través de roturas presentes en las mismas. En principio, las hifas colonizan las células corticales, para después infectar los vasos del xilema donde producirán conidios. Estos conidios pueden viajar por el sistema vascular y germinar, permitiendo el acceso a vasos colindantes (Prieto et al., 2009). Durante este proceso, la planta sintetiza compuestos de defensa que, junto con las enzimas líticas producidas por el hongo, bloquean el flujo del xilema por el sistema vascular, dificultando la absorción de agua y nutrientes por la planta. Una vez comienza la muerte de las células vegetales (fase necrótica), se promueve la síntesis de microesclerocios (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Estos vuelven al suelo gracias a la caída del material vegetal necrótico, como hojas y ramas. Todo este proceso lleva al desarrollo de los síntomas típicos de una enfermedad vascular, esto es: clorosis y secado de las hojas, defoliación y taponamiento de vasos (Lahkim, 2011), véase la Figura 1.4. Los síntomas pueden variar según la manifestación de la enfermedad: aguda o crónica. Generalmente, si árboles jóvenes se ven afectados de manera aguda por la enfermedad, se puede producir la muerte del árbol, o bien la clorosis de hojas y muerte de ramas. En cambio, los casos crónicos no suelen asociarse con muerte del árbol, pero al verse las ramas afectadas por necrosis, defoliación e incluso “momificación de los frutos”, se da una grave pérdida de producción (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011).



**Figura 1.4. Síntomas de la verticilosis del olivo.** (A) Olivo parcialmente afectado por la verticilosis, donde se observan ramas afectadas y ramas sanas. (B) Defoliación y clorosis de las hojas. (C) Necrosis de inflorescencias. (D) Momificación del fruto. Imagen tomada de López-Escudero y Mercado-Blanco (2011).

En este sentido, una de las estrategias empleadas tanto para el manejo de la verticilosis como para su prevención es el uso de cultivares tolerantes/resistentes a la enfermedad. Esta medida es una de las más económicas y eficientes para el control de la enfermedad, además de tener un mínimo impacto en el medio ambiente (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020; Valverde et al., 2023). Sin embargo, los genotipos de olivo más usados en agricultura corresponden con cultivares susceptibles o moderadamente susceptibles al patógeno, como Picual o Arbequina, mientras que los cultivares con mayores niveles de tolerancia, como es el caso de Frantoio, presentan unas características agronómicas poco deseables, como un largo periodo sin producción

## INTRODUCCIÓN

---

de fruto o poca resistencia a las heladas (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020; Valverde et al., 2023). Así, resulta de interés conocer los mecanismos subyacentes a esta resistencia/susceptibilidad, lo que permitiría conferir mayor tolerancia a genotipos más interesantes a nivel agronómico. En los últimos años, diversos estudios se han centrado en ello, incluyendo estudios transcriptómicos, bioquímicos e histológicos (Gharbi et al., 2017; Jiménez-Ruiz, Leyva-Pérez, Cabanás, et al., 2019; Jiménez-Ruiz et al., 2017; Leyva-Pérez et al., 2018; Markakis et al., 2010; Trapero et al., 2018). Con las evidencias obtenidas, parece claro que la susceptibilidad a la verticilosis del olivo está relacionada con una menor respuesta basal de defensa inducida por el patógeno, lo que favorece su proliferación, colonización y afección de la planta (Jiménez-Ruiz, Leyva-Pérez, Cabanás, et al., 2019; Jiménez-Ruiz et al., 2017; Ramírez-Tejero et al., 2021). La mayoría de los estudios realizados se han centrado en el papel de la genética del hospedador, sin embargo, poco se conoce sobre el posible rol de la microbiota de la raíz, zona de entrada del patógeno, en la susceptibilidad o tolerancia a la enfermedad. En este sentido, Fernández-González y colaboradores (2020) estudiaron la estructura, funcionalidad y redes de coocurrencia de las comunidades microbianas de la rizosfera y endosfera de dos cultivares con resistencias diferenciales a la verticilosis, Picual y Frantoio. Sus resultados mostraron una mayor abundancia de géneros bacterianos beneficiosos en el cultivar Frantoio. También observaron diferencias taxonómicas de las comunidades microbianas en las muestras de Picual ante la inoculación del patógeno, así como cambios en las redes de coocurrencia. Si bien este estudio apunta a una posible implicación de la microbiota radicular en la resistencia o tolerancia a la enfermedad, hasta la fecha de esta Tesis Doctoral no se había realizado ningún estudio en condiciones de campo, lo que podría aportar nueva información debido a la presencia de una comunidad microbiana más expuesta a fluctuaciones ambientales.

### **1.4.2. Estrés abióticos.**

El olivo es una especie con una alta resistencia a diferentes estrés abióticos, especialmente a la sequía, estando muy adaptado a condiciones de aridez como las que ocurren en la Cuenca Mediterránea (Carraro & Di Iorio, 2022; Fernández, 2014; Sofó et al., 2008). Sin embargo, esta capacidad de resistir la falta de agua requiere de una

serie de mecanismos que consumen recursos de la planta, afectando también a su crecimiento y productividad. En este sentido, numerosos estudios han ahondado en los mecanismos que subyacen a esta resistencia, que podrían dividirse en varios tipos, según la estrategia empleada: prevención, tolerancia, evasión y recuperación (Carraro & Di Iorio, 2022). En cuanto a la prevención, concierne a aquellos mecanismos que permiten al olivo limitar un posible estrés hídrico, incluyendo la regulación del cierre estomático y de la transpiración, cambios anatómicos en la hoja, aumento de la profundidad de las raíces para una mejor captación de agua o regulación del metabolismo del almidón para suplir de energía a la planta ante la caída de la fotosíntesis (Sofó et al., 2008; Tsamir-Rimon et al., 2021).

En cuanto a la tolerancia, se refiere a aquellos mecanismos que permiten al olivo resistir un nivel hídrico bajo en sus tejidos, manteniendo funciones metabólicas gracias a la regulación del sistema antioxidante y del ajuste osmótico (generando metabolitos que permitan mantener la turgencia celular), así como reparando daños oxidativos (mediante la expresión de enzimas específicas y la producción de compuestos polifenólicos) (Mechri et al., 2020; Sofó et al., 2008). Otro mecanismo es el de evasión de períodos de sequía en el ciclo reproductivo del olivo. En este sentido, el crecimiento del fruto se detiene durante el período estival, continuando el proceso de crecimiento y maduración con las primeras lluvias del otoño, por lo que se evitan los posibles efectos negativos de la falta de lluvia en el desarrollo del fruto. En la recuperación tras un período de estrés hídrico, se han observado cambios metabólicos en el olivo posiblemente dirigidos a la movilización de nutrientes para la planta (Dias et al., 2021).

A pesar de los mecanismos desarrollados por el olivo para resistir al estrés hídrico, los cambios histológicos y bioquímicos producidos afectan considerablemente al desarrollo de la planta. Así, diversos estudios han mostrado una importante caída en la productividad del olivo cuando es sometido a estrés hídrico prolongado (Brito et al., 2019; Cardoni & Mercado-Blanco, 2023; Fernandes-Silva et al., 2010; Patumi et al., 2002; Trabelsi et al., 2022). En este sentido, la prolongada sequía experimentada en Andalucía en los últimos años, llevó a que en la campaña 2021/2022 se recolectara un 49,1 % menos de fruto respecto a la campaña anterior, y un 47,5 % menos respecto a la media de las cinco últimas campañas (*Aforo de producción de olivar en Andalucía*, 2023).

## INTRODUCCIÓN

---

En cuanto a otro tipo de estreses abióticos, el olivo presenta una buena tolerancia a las altas temperaturas que se dan habitualmente en el período estival de la Cuenca Mediterránea, donde se pueden alcanzar los 45 °C (Cardoni & Mercado-Blanco, 2023). Sin embargo, las altas temperaturas pueden afectar al desarrollo del ciclo reproductivo del olivar, lo que tiene un impacto directo en la producción del fruto. De este modo, se ha comprobado que la temperatura óptima para el crecimiento de los brotes de olivo es de 10 a 30 °C, viéndose significativamente limitado a temperaturas superiores a los 35 °C (Benlloch-González et al., 2019). Además, también se ha descrito un adelanto en la floración del olivo cuando es sometido a temperaturas más elevadas (Benlloch-González et al., 2018; Pérez-López et al., 2008). Así, un estudio reciente de Benlloch-González y colaboradores (2019), evaluó el efecto de un aumento en 4 °C de la temperatura ambiente sobre el ciclo reproductivo completo del olivo. Según sus resultados, el aumento de temperatura llevaría a un retraso en la maduración del fruto, con una consecuente reducción del contenido de aceite del mismo, así como a una menor producción de fruto y de menor tamaño. Con el aumento de las temperaturas globales que estamos experimentando, siendo la Cuenca Mediterránea una de las regiones más vulnerables a estos fenómenos de cambio climático, resulta cada vez más necesario conocer cómo estos estreses pueden afectar a la productividad del olivar y desarrollar herramientas para reducir sus efectos sobre este cultivo (United Nations, 2020).

Otro de los estreses a los que puede verse sometido el olivar y que es de especial importancia en la Cuenca Mediterránea es la salinidad del suelo. Se prevé que el problema de salinización del suelo se agrave por fenómenos relacionados con el cambio climático, así como por prácticas agrícolas intensivas (Hassani et al., 2021). Esto incluye el uso de aguas salinas en la irrigación ante la falta de recursos hídricos, la salinización de acuíferos por el aumento del nivel del mar, aumento de la evapotranspiración en el suelo junto con cambios en los patrones de precipitación (lo que lleva a una deficiente lixiviación en el suelo), expansión de áreas de riego debido a la escasez de lluvias, así como prácticas deficientes de drenaje (Hassani et al., 2021). La salinidad afecta a la productividad vegetal por impedimentos en el flujo de agua, ya sea por afectar a la transpiración en hojas o por la reducción de la toma de agua en las raíces, lo que genera

un estrés osmótico y un desbalance nutricional en la planta (Hassani et al., 2021; Larbi et al., 2020). El olivo es moderadamente resistente a la salinidad, aunque esto es bastante dependiente del cultivar estudiado (Larbi et al., 2020; Mousavi et al., 2019; Tan et al., 2020). Su tolerancia se debe principalmente a mecanismos como la exclusión de sales de la raíz, reducción del transporte de las mismas a los tallos o exclusión de iones sodio y potasio de la hoja (Mousavi et al., 2019; Rossi et al., 2015; Tan et al., 2020).

Por último, otro de los estreses abióticos a los que se enfrenta el olivar es el uso excesivo de agroquímicos. Como se ha mencionado en apartados anteriores, el uso creciente de productos fitosanitarios en agricultura presenta riesgos para la biodiversidad del ecosistema y el estado del suelo. Esto puede afectar de manera indirecta a la salud y productividad vegetal, por disminuir la polinización, reducir especies que controlen plagas, empobrecer el suelo o agravar el impacto del cambio climático. Sin embargo, los efectos de los compuestos fitosanitarios en la planta no son solo indirectos, sino que existen numerosos mecanismos enzimáticos desarrollados por la planta para eliminar y evitar la acumulación de fitosanitarios en sus tejidos (Parween et al., 2016; J. J. Zhang & Yang, 2021). Cuando estos mecanismos no son suficientes, se pueden generar efectos indeseables en la salud vegetal, como los observados por H. Li y colaboradores (2020) en plantas de *Medicago sativa* expuestas a diferentes pesticidas. En este estudio, se observó una drástica reducción en la longitud de la raíz, altura y peso fresco de la planta, efectos que fueron revertidos cuando se inoculaban las plantas con un consorcio microbiano capaz de degradar los compuestos fitosanitarios utilizados. Desafortunadamente, existen pocos estudios que aborden esta problemática de manera específica para el olivar (Cardoni & Mercado-Blanco, 2023). Aun así, existe evidencia de la acumulación de pesticidas en el olivo, ya que han sido detectados en muestras de aceite de oliva por diversos autores (Amvrazi & Albanis, 2009; Medina-Pastor & Triacchini, 2020).

## 2. El microbioma del olivo y factores que lo modulan.

### 2.1. Composición del microbioma del olivo en diferentes tejidos.

La microbiota asociada al olivo ha sido descrita para diversos órganos y ha sido ampliamente revisada recientemente por Cardoni y Mercado-Blanco (2023). Así, el microbioma del olivo ha sido descrito para las hojas, frutos, flores, brotes, savia del xilema, tejido del xilema, rizosfera y endosfera radicular (Cardoni & Mercado-Blanco, 2023). En este sentido, los estudios sobre microbioma del olivo presentan gran variabilidad en cuanto a los genotipos estudiados, compartimentos analizados, factores moduladores incluidos así como técnicas de secuenciación empleadas. Esto genera cierta variabilidad en la composición del microbioma descrita, si bien se encuentran géneros cuya presencia parece ser común a diferentes órganos de la planta. Comenzando por la parte aérea del olivo (filosfera), diversos estudios han indagado en el microbioma de hojas y frutos. Parece existir un consenso en la presencia de *Pseudomonas* como uno de los géneros bacterianos más abundantes en hojas (considerando tanto epífitos como endófitos), frutos y ramas (Kakagianni et al., 2023; Malacrinò et al., 2022; Müller et al., 2015; Vergine et al., 2019; Vita et al., 2022). Además, este género también destaca por su alta abundancia relativa en el fluido xilemático (Anguita-Maeso et al., 2021). El género *Pseudomonas* resulta de interés para la salud de la planta, ya que se ha descrito su potencial como agente de biocontrol, específicamente para la verticilosis del olivo, así como en otras especies vegetales en la tolerancia a salinidad (Montes-Osuna et al., 2021; Vita et al., 2022), si bien también existen cepas patogénicas como la causante de la tuberculosis del olivo. En cuanto a la comunidad fúngica, varios estudios coinciden en encontrar los géneros *Aureobasidium* y *Cladosporium* como muy abundantes en tejidos aéreos del olivo (Abdelfattah et al., 2015; Costa et al., 2021; Preto et al., 2017). En cuanto al potencial papel de estos géneros en la salud vegetal, aislados del género *Cladosporium* han mostrado la capacidad de promover el crecimiento vegetal y de actuar como agentes de biocontrol en especies herbáceas (Hamayun et al., 2009; Răut et al., 2021; X. Wang et al., 2013). Respecto a la microbiota asociada a las raíces del olivo, existe un considerable menor número de estudios que utilicen técnicas de secuenciación masiva y aborden el análisis

tanto de la comunidad bacteriana como de la fúngica. Fernández-González y colaboradores (2019) describieron la comunidad bacteriana y fúngica de 36 genotipos de olivo crecidos en la Colección Mundial de Germoplasma de Olivo (WOGC, del inglés *World Olive Germplasm Collection*) tanto a nivel de rizosfera como de endosfera de la raíz. La comunidad endófitas de la raíz estuvo dominada por el phylum *Actinobacteria*, en consecuencia, los géneros más abundantes de este compartimento fueron *Actinophytocola*, *Streptomyces* y *Pseudonocardia*. En cuanto a la rizosfera, los géneros más abundantes fueron *Gp6*, *Gp4* (*Acidobacteria*), *Rhizobium* y *Sphingomonas* (*Proteobacteria*). Por su parte, la comunidad fúngica de la raíz estuvo compuesta por *Canalisporium*, *Aspergillus*, *Minimelanolocus* y *Macrophomina*. Muchos de los géneros identificados en la raíz tienen un potencial papel beneficioso en la salud de la planta, destacando los géneros actinobacterianos como *Actinophytocola* y *Streptomyces*, para los cuales se encuentra amplia evidencia sobre su potencial papel beneficioso para la salud vegetal, tanto promoviendo el crecimiento vegetal como en la protección frente a patógenos (Bouznada et al., 2016; Fernández-González et al., 2021; Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016). Por último, las comunidades de arqueas han recibido poca atención en lo que respecta al microbioma del olivo. En este sentido, Müller y colaboradores (2015) encontraron arqueas endófitas de la hoja por secuenciación masiva pertenecientes a los phyla *Thaumarchaeota* y *Crenarchaeota*. Sin embargo, esto no fue corroborado por Vergine y colaboradores (2019), quienes no detectaron arqueas en hoja. Por su parte, Kakagianni y colaboradores (2023) encontraron una abundancia relativa extremadamente baja de arqueas en hojas y carposfera, mientras que su abundancia en raíz fue mayor, destacando la clase *Nitrososphaeria*. En general, existe un bajo número de estudios centrados en las comunidades de arqueas asociadas a plantas y en sus efectos en la salud vegetal. Sin embargo, hay cierta evidencia sobre su potencial papel beneficioso para la planta, como en la solubilización y ciclo de los nutrientes. En este sentido, *Nitrosocosmicus oleophilus* MY3 mostró capacidad de promover el crecimiento de *Arabidopsis* por oxidación de amonio en formas asimilables por la planta (Jung et al., 2020).

A pesar de los estudios realizados en diferentes compartimentos del olivo, existen aún órganos completamente inexplorados, como es el caso de las semillas. El

## INTRODUCCIÓN

---

microbioma de las semillas atrae cada vez más interés por parte de la comunidad científica debido al impacto de los microorganismos colonizadores de la semilla en su germinación y crecimiento de la planta, así como por constituir un reservorio de microorganismos beneficiosos muy poco estudiado (Bergna et al., 2018; Goggin et al., 2015; Simonin et al., 2022; Walitang et al., 2017; Wassermann, Adam, et al., 2019; Wassermann et al., 2021). En este sentido, existen ejemplos tales como el endófito de semilla *Sphingomonas melonis*, que ha sido identificado como agente protector contra el patógeno transmitido por semilla *Burkholderia plantarii* en arroz (*Oryza sativa* L.) (Matsumoto et al., 2021). En trigo, se ha visto la presencia de ciertos endófitos de semilla en variedades resistentes a la sequía, que utilizados como inoculantes en planta, han promovido el crecimiento vegetal bajo condiciones de falta de agua (Hone et al., 2021). Debido al creciente interés en el estudio del microbioma de semillas, se han publicado artículos como el de Simonin y colaboradores (2022), donde se analizan datos publicados sobre microbioma de semillas de diferentes especies vegetales. Estos autores encuentran un microbioma compartido entre semillas formado por los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Cladosporium* y *Alternaria*. Sin embargo, poco se conoce sobre el microbioma de semillas de especies leñosas, incluyéndose solo una especie de leñosa en este metaanálisis (en concreto, *Quercus robur* L.), existiendo escasos estudios centrados en otras especies leñosas (Abdelfattah et al., 2021; Fort et al., 2021; Heitmann et al., 2021).

Dentro de los tejidos mencionados, el microbioma radicular resulta de especial importancia por su papel en la salud vegetal (Bai et al., 2022; Compant et al., 2019; Trivedi et al., 2020). Diversos estudios han demostrado el papel del microbioma de la raíz en la regulación de la nutrición de las plantas (Bai et al., 2022; Trivedi et al., 2020). En este sentido, los microorganismos asociados a las raíces pueden mejorar el acceso de la planta a nutrientes aumentando la biodisponibilidad de los mismos (como fósforo o hierro), mediante mecanismos como solubilización, quelación y oxidación. Además, también tienen funciones moduladoras de la estructura radicular, mejorando el acceso a recursos hídricos y minerales (Bai et al., 2022; Trivedi et al., 2020). Asimismo, parece que el microbioma de la raíz no solo influye directamente en la accesibilidad a nutrientes, sino también en la regulación de su difusión a través de la endodermis,

mediante el control de la suberificación (Kandhol et al., 2023). Por otro lado, las bacterias de la rizosfera y de la endosfera radicular pueden participar en la resistencia a patógenos tanto por el antagonismo directo mediante la producción de metabolitos con acción antibiótica como por la activación de la respuesta sistémica inducida en la planta. Por último, diversos estudios han demostrado los efectos beneficiosos de ciertos miembros de la microbiota de la raíz en la resistencia a estreses abióticos como la sequía o la alta salinidad (Bai et al., 2022; Ravanbakhsh et al., 2019; Trivedi et al., 2020). Teniendo todo lo mencionado en cuenta, la microbiota radicular del olivo podría suponer una fuente de microorganismos potencialmente beneficiosos para la lucha contra los principales estreses o enfermedades que afectan a este cultivo. Respaldao esta hipótesis, se han aislado tanto bacterias como hongos colonizadores de la raíz de olivo que presentan actividades prometedoras en la resistencia a enfermedades (Cardoni & Mercado-Blanco, 2023). Entre ellos, destaca *Pseudomonas simiae* PICF7, aislada de raíces del genotipo Picual y que ha demostrado antagonismo contra *V. dahliae* tanto *in vitro* como *in planta* (Prieto et al., 2009). Sin embargo, el potencial de estos aislados microbianos sobre olivo, bien para promover el crecimiento o la resistencia frente a estreses, ha sido poco evaluado. Montes-Osuna y colaboradores (2021) estudiaron la respuesta a sequía en olivos tratados con las rizobacterias *Pseudomonas* spp. PICF6 y PICF7, previamente identificadas como potencialmente beneficiosas en la resistencia a sequía. Sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre plantas inoculadas y control para ninguna de las cepas analizadas, ni para la combinación de las mismas (Montes-Osuna et al., 2021). Recientemente, Ait-Ouakrim y colaboradores (2023) aislaron 24 rizobacterias de olivo que presentaron actividades solubilizadoras de fosfato, pero no evaluaron los beneficios en el crecimiento del olivo. Por lo tanto, la descripción de la microbiota de raíz del olivo así como el aislamiento de los miembros de esta comunidad supone un área relativamente inexplorada, aunque con gran potencial para generar herramientas biotecnológicas con aplicación al olivar.

### 2.2. Factores que modulan el microbioma del olivo

Ante el incremento de la intensificación agrícola y de los fenómenos asociados al cambio climático, el conocimiento sobre las repercusiones ambientales de la agricultura va en aumento, así como el interés en la búsqueda de alternativas más sostenibles. En este sentido, es bien conocido el beneficio que la microbiota de la planta ejerce en la salud vegetal, influyendo en la disponibilidad y absorción de nutrientes, productividad vegetal y resistencia a estreses abióticos (Compant et al., 2019). De esta manera, el conocimiento de los factores involucrados en la estructuración de las comunidades microbianas permitiría avanzar en la comprensión sobre las interacciones planta-microbioma, con implicaciones en la salud vegetal y en la aplicación eficiente de bioinoculantes (Cardoni & Mercado-Blanco, 2023; Compant et al., 2019). Entre los factores conocidos, el genotipo de la planta determina la estructuración de la comunidad microbiana mediante diversos mecanismos, como la producción de exudados radiculares o moléculas señalizadoras que regulan la defensa en plantas (como el ácido salicílico o el ácido jasmónico) (Bressan et al., 2009; Lebeis et al., 2015; Wagner et al., 2016). Así, diversos estudios han indagado en la influencia del genotipo en el microbioma de diferentes tejidos del olivo, confirmándose su importancia por diversos autores para hojas, suelo, fruto, raíces y savia del xilema (Anguita-Maeso et al., 2020; Fernández-González et al., 2019; Malacrinò et al., 2022). En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se evaluó el microbioma de la raíz de diferentes genotipos de olivo cultivados en condiciones controladas en la WOGC. Los resultados mostraron cómo las comunidades microbianas radiculares del olivo se estructuraban de manera diferencial en función al genotipo evaluado, a pesar de que los olivos fueron muestreados en el mismo día y estaban expuestos a las mismas condiciones ambientales (Fernández-González et al., 2019). Si bien estos resultados apuntan de manera clara a la importancia del genotipo del olivo en la estructuración de la comunidad microbiana, la mayoría de estos estudios evalúan la influencia de un único factor, existiendo la necesidad de trabajos más integrativos, donde bajo un mismo diseño experimental se analicen diferentes factores. Como ejemplo, Müller y colaboradores (2015) estudiaron la comunidad bacteriana y de arqueas de las hojas de olivo teniendo en cuenta diversos

factores como el genotipo, las condiciones del suelo y condiciones climáticas. Sus resultados mostraron que el genotipo era el factor que mejor explicaba las diferencias encontradas en las comunidades microbianas (Müller et al., 2015). Sin embargo, un estudio reciente de Kakagianni y colaboradores (2023) concluyó que el ciclo biológico era el factor más importante en determinar la estructura del microbioma de filosfera y carposfera. A pesar de esto, sus resultados muestran que el genotipo fue el factor que mejor diferenciaba las comunidades microbianas de la rizosfera (Kakagianni et al., 2023). Por ende, futuros estudios serán necesarios en el caso del olivar, integrando un mayor número de genotipos y otros factores agronómicos y climáticos para generar un modelo más completo sobre la modulación de su microbioma en diferentes compartimentos.

Otro de los factores que puede ejercer una influencia en el microbioma del olivo es el manejo agrícola aplicado. En este sentido, es conocido que el manejo agrícola afecta a las comunidades microbianas del suelo y de la planta tanto por la alteración de los niveles nutricionales asociada a la aplicación de fertilizantes como por el efecto de pesticidas en rutas metabólicas microbianas (Bevivino et al., 2014; Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Lo, 2010; Sharaf et al., 2021; Windisch et al., 2021; Yu et al., 2023). En el caso del olivo, diversos estudios han indagado sobre la influencia del manejo en su microbioma. Llimós y colaboradores (2021) encontraron una mayor riqueza bacteriana en suelos con enmiendas orgánicas en compar

ación a una fertilización mineral. Por otra parte, Sofo y colaboradores (2014) encontraron un mayor número de bacterias y hongos cultivables en suelos de olivos bajo un manejo agronómico menos invasivo, en el que no se llevaba a cabo labranza y los residuos de poda eran utilizados como mantillo para el acolchado del suelo. En cuanto a otros compartimentos vegetales, se ha descrito un enriquecimiento en bacterias con potenciales funciones beneficiosas para la planta en la superficie foliar y savia del xilema de olivos bajo un manejo sin labrado y con uso de acolchado vegetal (Fausto et al., 2018). Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias destacables en términos de diversidad y estructuración de la comunidad. Por otro lado, Caliz y colaboradores (2015), encontraron una abundancia significativamente mayor de bacterias oxidadoras de amonio en la rizosfera de olivos bajo enmienda orgánica en comparación a

## INTRODUCCIÓN

---

fertilización mineral, si bien su estudio incluyó un gran número de genotipos de olivo y diferentes localizaciones, lo que puede dificultar el análisis individualizado de los efectos del manejo agrícola. En cuanto al uso de cubiertas vegetales, se ha descrito su influencia en la estructura de la comunidad micorrícica arbuscular de la raíz de olivo, cambiando significativamente en sistemas donde la cubierta es eliminada mediante laboreo (Palla et al., 2020). Teniendo en cuenta los estudios mencionados, no existe un gran número de trabajos centrados en el efecto del manejo agrícola en el microbioma del olivo. Dentro de dichos trabajos, algunos se basan en técnicas dependientes de cultivo y otras menos resolutivas que la secuenciación masiva, lo que limita su alcance y precisión, dando una visión incompleta de la comunidad microbiana en su interacción con la planta bajo diferentes tipos de manejos agrícolas. Por otro lado, existen múltiples prácticas agrícolas que pueden influir en el microbioma del olivo y cada estudio se centra en diferentes prácticas o combinaciones de ellas, lo que también dificulta la comparación de resultados. Además, algunos trabajos incluyen otros factores que pueden introducir variabilidad, como la localización, eventos climáticos o genotipos diferentes de olivo. No obstante, teniendo en cuenta las evidencias encontradas para otras especies vegetales y para el olivo en particular, resulta de interés la realización de estudios que ahonden en el efecto del manejo en sus comunidades microbianas, especialmente en las de la raíz, que se encuentran más directamente expuestas a las condiciones del suelo.

Otros factores que han sido estudiados para el caso del olivar incluyen estreses bióticos y abióticos. En cuanto a los estreses abióticos, Vita y colaboradores (2022) evaluaron el efecto del estrés salino en las comunidades endófitas de la hoja de varios genotipos de olivo, encontrando un enriquecimiento en géneros como *Ralstonia* y *Burkholderia*. En cuanto a los estreses bióticos, diversos trabajos se han centrado en estudiar los cambios en las comunidades microbianas del olivo ante la infección por un patógeno, así como la posible relación entre la resistencia de ciertos genotipos a dichos patógenos y su comunidad microbiana. Vergine y colaboradores (2019) estudiaron la comunidad bacteriana y fúngica de hojas y ramas de olivos del genotipo Leccino, resistente a la infección por *Xylella fastidiosa* y el genotipo Cellina di Nardò, susceptible a la enfermedad. En ambos casos se analizó la composición de la comunidad microbiana en árboles infectados y no infectados, encontrándose una clara diferencia entre

genotipos. Para el genotipo sensible, se observó una alteración de la comunidad microbiana tras la infección, mientras que no se observaron cambios en el genotipo resistente (Vergine et al., 2019). Sin embargo, Giampetruzzi y colaboradores (2020) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comunidad microbiana asociada al xilema de dos genotipos con resistencias diferenciales a *X. fastidiosa*. La verticilosis del olivo es otro estrés biótico donde resulta de interés el estudio de la implicación de la microbiota debido a la ocurrencia de cultivares altamente resistentes y altamente sensibles a la enfermedad. En este sentido, Fernández-González y colaboradores (2020) encontraron un enriquecimiento en géneros bacterianos beneficiosos en el genotipo resistente Frantoio, así como cambios en la composición de la comunidad bacteriana de la raíz de Picual frente a la inoculación del patógeno. La aproximación metatranscriptómica de la enfermedad hecha por Martí y colaboradores (2020) muestra la complejidad asociada al proceso y cómo la comunidad microbiana se modula de manera significativa durante la infección.



# **OBJETIVOS**



**OBJETIVOS**

El cultivo del olivo constituye una pieza clave para la economía, cultura y desarrollo rural de la Cuenca Mediterránea, siendo España el principal productor y exportador de aceite de oliva del mundo. Sin embargo, este cultivo se ve cada vez más amenazado por diferentes estreses, que se ven relacionados con los fenómenos asociados al cambio climático. Dentro de ellos, destaca el manejo agrícola, con una tendencia a la intensificación de los cultivos (altas densidades arbóreas por finca), mayor consumo de fitosanitarios y de agua para regadío. Esto afecta de diferentes maneras al agroecosistema, tanto por la disminución de la biodiversidad de flora y fauna, como por los cambios en la estructura y composición nutricional del suelo, así como por los efectos en las comunidades microbianas asociadas a la planta. Todo ello conlleva ecosistemas menos resilientes a estreses, tanto a los de tipo abiótico (por ejemplo, mayor pérdida de suelo bajo regímenes de lluvia intensos) como a estreses bióticos, tales como la verticilosis del olivo. Por tanto, existe un creciente interés en la búsqueda de prácticas agrícolas más sostenibles, donde destacan aquellas que permitan mantener y enriquecer el suelo y la planta con una microbiota beneficiosa, así como la búsqueda y aislamiento de microorganismos promotores del crecimiento vegetal para su aplicación en campo. En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral se enfoca en investigar el microbioma de la raíz y del suelo rizosférico del olivo en respuesta a diversos tipos de estrés, como el manejo agrícola aplicado y la verticilosis del olivo. Además, se busca describir y aislar bacterias potencialmente beneficiosas que habitan en compartimentos menos explorados en el olivo. Para abordar este objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

## OBJETIVOS

---

1. Generar un flujo de trabajo optimizado y reproducible con el objeto de facilitar los análisis de datos en estudios de ecología microbiana.
2. Estudiar la posible variación de las comunidades microbianas asociadas a plantas leñosas silvestres y cultivadas en el suelo suelto, rizosférico y en la endorrizosfera en lugares cercanos pero sometidas a condiciones de manejo muy diferentes (convencional, sin manejo y con manejo orgánico).
3. Estudiar la posible implicación de las comunidades microbianas de la rizosfera de olivo frente a verticilosis utilizando dos genotipos con susceptibilidades diferenciales a la misma (Frantoio, resistente; Picual, sensible).
4. Evaluación del impacto de la aplicación de estiércol de oveja al suelo en la composición y estructura de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) asociada a las raíces (rizosfera y endosfera), así como en la predicción de funciones metabólicas y ecológicas y en la biomasa microbiana de la rizosfera, en condiciones de campo.
5. Obtener aislados bacterianos de la endorrizosfera del olivo que presenten una abundancia relativa alta en este compartimento y que se hayan identificado como potencialmente beneficiosos para la salud de la planta.
6. Describir la composición de la microbiota de la semilla de olivo de diferentes genotipos, así como identificar la microbiota compartida con la comunidad microbiana de la endorrizosfera.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### M.1. ZONAS DE ESTUDIO

#### M.1.1. Mancha Real

En el municipio de Mancha Real, provincia de Jaén (España), se tomaron muestras de suelo rizosférico y suelo suelto tanto de un olivar como de un encinar adyacentes. En esta área de estudio, se seleccionó un cultivo de olivos que estaba establecido en la zona durante décadas y que estaba sometido a un manejo convencional sin cubierta vegetal y con riego por goteo. Este olivar se había sembrado sustituyendo parte de un bosque autóctono de encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota* en su mayoría), de manera que el cultivo se encontraba rodeado de encinas en el momento de la toma de muestras. Dentro del olivar, se podían encontrar ejemplares pertenecientes a dos genotipos de olivo diferentes: Picual y Frantoio. La localización de la finca se indica con coordenadas GPS y se puede encontrar en la Tabla M1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla M1. Se muestran las diferentes zonas de muestreo, los acrónimos usados y su localización con coordenadas GPS.** También se indican otros detalles de la zona de muestreo en el apartado de descripción. OLR: Olivar (suelo rizosférico), OLB: Olive bulk soil (suelo suelto de olivar), HOR: Holm oak (rizosfera de encina), HOB: Holm oak bulk soil (suelo suelto de encinar), OM: finca con manejo orgánico de Lupión, CM: finca con manejo tradicional de Lupión, AR: Arbequina, FR: Frantoio, KA: Kalinjot, ME: Menorca, US: Uslu, BA: Barnea, JA: Jaén, KO: Koroneiki, PI: Picual, VV: Verde Verdelho, m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar.

Zona	Acrónimo	Localización	Descripción
Mancha Real	OLR y OLB	37° 53' 16,8" N; 03° 38' 06,1" W; 480 m.s.n.m.	Finca de olivos (genotipos Picual y Frantoio) con manejo convencional (sin cubierta y con uso de fitosanitarios y fertilizantes) de la que se tomó suelo rizosférico (OLR) y suelo suelto (OLB)
	HOR y HOB		Bosque de encinas adyacente al olivar OL, de la que se tomó suelo rizosférico (HOR) y suelo suelto (HOB)
Lupión	OM	37° 59' 56,2" N; 03° 35' 16,3" W; 325 m.s.n.m,	Finca de olivos (genotipo Picual) con manejo orgánico, incluyendo uso de estiércol ovino
	CM		Finca de olivos (genotipo Picual) con manejo convencional (sin cubierta y con uso de fitosanitarios y fertilizantes)
Colección Mundial de Germoplasma de Olivo (WOGC)	AR	37° 51' 38,11"N; 04° 48' 28,61"W; 102 m.s.n.m.	Semilla de olivo tomada del genotipo Arbequina (origen España)
	FR		Semilla de olivo tomada del genotipo

		Frantoio (origen Italia)
	KA	Semilla de olivo tomada del genotipo Kalinjot (origen Albania)
	ME	Semilla de olivo tomada del genotipo silvestre Menorca (acebuche)
	US	Semilla de olivo tomada del genotipo Uslu (Turquía)
	BA	Semilla de olivo tomada del genotipo Barnea (Israel)
	JA	Semilla de olivo tomada del genotipo silvestre Jaén (acebuche)
	KO	Semilla de olivo tomada del genotipo Koroneiki (Grecia)
	PI	Semilla de olivo tomada del genotipo Picual (España)
	VV	Semilla de olivo tomada del genotipo Verde Verdelho (Portugal)

### **M.1.2. Lupión.**

Las zonas de muestreo seleccionadas para esta parte del estudio se localizaron en el municipio de Lupión, provincia de Jaén (coordenadas en la Tabla M1). Se muestreó una finca con manejo convencional y otra con manejo orgánico. Las dos fincas presentaban un único genotipo de olivo: Picual. Los detalles de cada zona de muestreo se presentan a continuación:

- i. **CM.** Finca de olivos con manejo convencional, es decir, con aplicación de productos fitosanitarios no ecológicos, ausencia de cubierta vegetal y arado. Específicamente, los herbicidas utilizados fueron GLIFOVER (Nutesca, Jaén, España), Tragli Gold (BRANDT EUROPE, S.L., Sevilla, España), MINSK (KENOGARD,

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Barcelona, España) y PROTIBEL (PROBELTE, S.A.U, Murcia, España). Se utilizaron insecticidas y fungicidas (oxicloruro de cobre, 25 %) una vez al año. Los productos específicos utilizados como insecticidas fueron RITMUS (PROBELTE, S.A.U, Murcia, España) y DAFENE PROGRESS (Bayer CropScience, S.L, Valencia, España). Se aplicó fertilización química tanto de manera foliar (AMISAN 80 %, AMISAN REVITALIZADOR, ESTESAN 18-13-27 y ESTESAN 3,5-0-42-1MgO, todos ellos suministrados por Nutesca, S.L, Jaén, España) como al suelo (sulfato amónico, 3,5 kg por olivo y año). En esta finca, la última aplicación de herbicidas se realizó 6 meses antes del muestreo. No presenta riego por goteo.

- ii. **OM.** Esta finca es adyacente a la finca CM. Presentaba un manejo orgánico, sin aplicación de herbicidas. El suelo recibía aplicación de enmienda orgánica, en concreto, estiércol de oveja (350 kg por hectárea) cada dos años durante al menos 7 años. Además, se aplicaban al suelo cloruro potásico y Flecotec 4 SMART (ICL Specialty Fertilizers Iberia, Murcia, España), un fertilizante ecológico certificado que aporta potasio, calcio, magnesio y azufre, como aporte de nutrientes inorgánicos. El cultivo era de secano, al igual que el convencional.

### M.1.3. Colección Mundial de Germoplasma de Olivo (WOGC)

Las muestras seleccionadas para el análisis del microbioma de semillas de olivo fueron tomadas de la Colección Mundial de Germoplasma de Olivo (WOGC, por sus siglas en inglés), perteneciente al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) localizado en la Alameda del Obispo (Córdoba, España) y se seleccionaron 10 genotipos diferentes (Belaj et al., 2012). Se incluyeron genotipos que son originalmente empleados para su cultivo en diferentes localizaciones geográficas, así como dos genotipos silvestres (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*). De esta manera se pretendió obtener una amplia representación geográfica del cultivo del olivar. La lista con los genotipos elegidos se puede ver en la Tabla M1.

### M.2. TOMA DE MUESTRAS

#### M.2.1. Suelo suelto

La toma de muestras de suelo suelto se realizó tanto para el muestreo de Mancha Real como para las fincas OM y CM, pero con diferentes objetivos.

En el muestreo de Mancha Real se tomaron 5 muestras de suelo suelto tanto en el olivar (*Bulk soil* de OL, OLB) como en el encinar (*Bulk soil* de HO, HOB). Cada muestra se tomó entre dos árboles (entre dos olivos o dos encinas), evitando la zona cercana a los árboles y bajo la influencia de sus raíces. En cada punto se tomaron unos 500 g de suelo. Estas muestras fueron utilizadas tanto para determinar la comunidad microbiana en el suelo suelto como para determinar las propiedades fisicoquímicas del mismo. El muestreo se realizó en mayo del 2018, con los olivos completamente en flor.

En el caso de la comparación entre manejo orgánico y convencional, se procedió de igual modo pero tomando 12 muestras (una por árbol) de unos 300 gramos de suelo. Estas muestras fueron mezcladas cuatro a cuatro para generar tres réplicas. Este muestreo se llevó a cabo en noviembre de 2020, en el momento de la recolección de la aceituna. En este caso, sólo se determinaron las propiedades fisicoquímicas del suelo.

Todas estas muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento en las 48 h posteriores.

#### M.2.2. Raíces y suelo rizosférico.

El suelo rizosférico fue muestreado en el olivar y el encinar de Mancha Real (OL y HO), así como en las fincas con manejo orgánico y convencional (OM y CM). En ambos casos el muestreo se realizó de la misma forma. Para garantizar la representatividad, para cada árbol se recogieron cuatro muestras en puntos diferentes (en dos zonas opuestas, N=lado norte y S=lado sur). Tras eliminar la capa superior del suelo (5 cm), se siguieron las raíces principales de cada planta hasta encontrar raíces jóvenes y no suberificadas a unos 5 a 20 cm de profundidad. Para las muestras de rizosfera, se recogió

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

el suelo firmemente adherido a las raíces activas. Tanto las raíces como el suelo rizosférico fueron almacenados a 4 °C para su posterior procesamiento.

En el caso de las raíces, estas fueron esterilizadas superficialmente siguiendo el protocolo utilizado por Fernández-González y colaboradores (2020). Primero, las raíces fueron lavadas con 20 mL de NaCl al 0,8 % mediante vórtex para eliminar la tierra adherida. A continuación, se realizaron 5 lavados con vórtex en agua destilada. La esterilización de la superficie se llevó a cabo de la siguiente manera: incubación de las raíces en agitación por inversión con alcohol al 70 % durante 5 min, hipoclorito sódico (3,7 %) y Tween 20 al 0,01 % durante 3 min y, por último, tres lavados en agua destilada estéril. A continuación, se almacenaron a - 80 °C hasta su procesamiento. Para confirmar la eficacia del protocolo de desinfección, se colocaron alícuotas del agua estéril utilizada en el lavado final en placas de NA (agar nutritivo) y LB (Luria Bertani) y se incubaron a 28 °C durante 7 días. A continuación, se examinaron las placas para detectar la presencia o ausencia de microorganismos contaminantes (Fernández-González, Cardoni, et al., 2020).

### **M.2.3. Semillas**

El muestreo de semillas de olivo se llevó a cabo sobre 10 genotipos diferentes. Para cada genotipo, se muestrearon dos árboles. De los frutos obtenidos, se seleccionaron 5 de cada árbol, considerando aquellos sin daños externos visibles. Por lo tanto, por cada genotipo se obtuvieron 10 réplicas.

Para evitar la contaminación de las semillas durante el proceso de extracción, primero se obtuvieron los huesos de las aceitunas (endocarpio) y se esterilizaron superficialmente antes de extraer la semilla del interior. Para ello, se retiró la pulpa de la aceituna (epicarpio y mesocarpio) con un cuchillo, para posteriormente limpiar el hueso de la aceituna de cualquier resto usando una esponja de cocina. Una vez limpios los huesos, se enjuagaron en agua y se dejaron secar completamente. Después, los huesos se esterilizaron superficialmente de la siguiente manera (i) etanol al 96 % durante 1 min, (ii) NaClO comercial diluida (10 % v/v) durante 1 min y finalmente (iii) 3 enjuagues en agua estéril y destilada. Una vez esterilizado el endocarpio, se obtuvieron

las semillas rompiéndolo con un cortatubos estándar, previamente esterilizado con etanol al 96 %. Se eligió este método como el mejor para la obtención de semillas, teniendo en cuenta la dureza del hueso de aceituna. Las semillas se liofilizaron y congelaron hasta su posterior procesamiento.

### **M.3. PROPIEDADES FISCOQUIMICAS DEL SUELO Y CONCENTRACIÓN DE FITOSANITARIOS.**

En el estudio de Mancha Real, los parámetros fisicoquímicos del suelo se determinaron gracias a los procedimientos estandarizados del Laboratorio Agroalimentario de la Junta de Andalucía localizado en Córdoba. Para las muestras de las fincas OM y CM, los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de fitosanitarios se determinaron por la empresa L.A.B Innovación Analítica (A Tentamus Company, Almería, España). En dicho análisis se cuantificaron 516 compuestos diferentes. Los diferentes parámetros fisicoquímicos y fitosanitarios medidos se encuentran en la Tabla M2.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla M2. Parámetros fisicoquímicos y productos fitosanitarios medidos en las diferentes fincas de muestreo.** Los parámetros fisicoquímicos indicados con \* fueron solo medidos en las fincas de Lupión (CM y OM). Los demás fueron medidos tanto en esas fincas como en las de Mancha Real (OL y HO).

<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	Arcilla (%)
	Arena (%)
	Limo (%)
	Conductividad (salinidad) ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
	pH
	Textura del suelo
	Capacidad de intercambio catiónica (CEC) en mEq/100g
	Calcio (mEq/100g)
	Magnesio (mEq/100g)
	Sodio (mEq/100g)
	Potasio (mEq/100g)
	Potasio asimilable (mg/kg) *
	Carbonatos (%)
	Caliza activa (%)
	Fósforo (%)
	Fósforo asimilable (mg/kg) *
	Materia orgánica (%)
	Materia orgánica oxidable (%) *
	Relación Carbono/nitrógeno
	Nitrógeno orgánico (%)
	Nitrógeno total (%)
	Nitrato (mg/L)*
	Bicarbonato (mg/L)*
	Sulfato (mg/L)*
	Potasio de intercambio (mg/Kg)

<p><b>Herbicidas</b></p>	<p>Alachloro, Bifenox, Bromacyclo, Cycloate, Clozolate, Diflufenican, Etridiazole, Fenson, Butralin, Clodinafop-propargyl, Atrazine, Atrazine-desisopropyl Atrazine-desisopropyl, Bentazone, Bromoxynil, Chloridazone, Chlorsulfuron, Cyanazine, Diclobutrazol, Dichlorprop, Diuron, Carfentrazone-ethyl, Cycloxydim, Clomazone, Dimefuron, Total folpet, Hexazinone, Propanil, Sulprophos, Tefluthrin, Ametryn, Atrazine-desethyl, Bensulfuron-methyl, Chlorotoluron, Cinosulfuron, Ethofumesate, Amisulbrom, 2,6-dichlorobenzamide, Dimethachlor, Etoxazole, Fenbuconazole, Fluazinam, Flufenacet, Fluometuron, Flurochloridone, Flurprimidol, Flusilazole, Imazamox, Isoproturon, Linuron, Metobromuron, Metosulam, Molinate, Monolinuron, Napropamide, Oxamyl, Pinoxaden, Propoxycarbazone, Quinmerac, Quizalofop, Setoxydim, Simazine, Thiencarbazone-methyl, Thiocyclam, Triasulfuron, Tralkoxydim, Trichlorfon, Fensulfotion, Foxim, Metabenzthiazuron, Pirasulfutole, Phenoxaprop-P-ethyl, Total fluacifop, Fluacifop-P-butyl, Fluroxypyr, Lenacil, Oxadiargyl, Picloram, Quinclorac, Quizalofop-ethyl, Teflubenzuron, Tepraloxym, Triclopyr, Iodosulfuron-methyl, Terbutylazine, Haloxyfop-methyl, Isoprocab, Mesotrione, Pencycuron, Profoxydim, Prometryn, Propaquizafop, Propyzamide, Prosulfocarb, Prosulfuron, Sulcotrione, Terbumeton, Thifensulfuron-methyl, Haloxyfop, Clethodim, 2,4 D, Terbumeton desethyl, Haloxyfop, Triethazine</p>
<p><b>Plaguicidas</b></p>	<p>Carbendazim+, Metalaxyl, Acclonifen, Benfluralin, Captan, Cyproconazole, Famoxadone, Hexachlorocyclohexane, 1,1-dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethane, Bupirimate, Cadusafos, Carbophenothion, Chlordane, Chlorfenvinphos, Chlorophenson, Chlorpyrifos-methyl, Crimidin, Deltamethrin, Diclofention, Dieldrin, Ditalimfos, Ethion, Fenclorphos, Fenitrothion, Phenthoate, Bromophos-ethyl, Diphenylamine, 4-chloro-3-methylphenol, p,p'-DDE, Benalaxyl, Chloroneb, Difenconazole, Dimethomorph, Etrimfos, Kresoxim-methyl, Tetrahydrophthalimide, Acrinathrin, Bifenthrin, Bromophos, Bromopropylate, Carbetamide, Chlorfenapyr, Chlorobenside, Chloropropylate, Chlorpyrifos, Chlorthal-dimethyl, Cyflufenamid, Cypermethrin, Diazinon, Dichloran, Dichlorvos, Ethoprophos, Fempropathrin, Methamidophos, Phenothrin, Phention, Total Captan, Total endosulfan, Cyanophenphos, p,p'-DDDT, 2-phenylphenol, Fenvalerate+Esfenvalerate, HCH-alpha, Fludioxonil, Fluotrimazole, Folpet, Furalaxyl, Hexaconazole, Iprodione, Myclobutanil, Oxadiazon, Oxyfluorfen, Pyridaben, Tetraconazole, Cymoxanil, Cyprodinil, Dimethenamid, Dimoxystrobin, Spiroxamine, Spiroclifen, Spirotetramat-enol, Spirotetramat-ketohydroxy, Fonofos, Fosalon, Heptachlor, HCH-beta, Lambda-Cyhalothrin, Lindane, Methidathion, Nitrofen, o,p-DDD, Parathion-methyl, Permethrin, Pirimiphos-ethyl, Tau-fluvalinate, Technazene, Chloroxuron, Coumaphos, Desmediphan, Dialate, Emamectin, Aminocarb, Ametocradin, Amitraz, Azadirachtin, Bendiocarb, Bifenazate, Bixafen, Butocarboxim, Butoxycarboxim, 3-hydroxycarbofuran, Cyantraniliprole, Climbazole, Dietofencarb, Dinotefuran, Dodemorph, Epoxiconazole, Ethiofencarb-sulfone, Ethiprole, Ethiofenprox, Flumioxazine, Phthalimide, Formotion, Dodin, Carbaryl, Carboxin, Boscalide, Bromuconazole, Chlorpropham, Chlorantraniliprole, Cyflumetofen, Diflubenzuron, Diniconazole, Dinoterb, Ethiofencarb, Ethirimol, Fenbuconazole, Fluazinam, Fludioxonil, Fluopyram, Hexaconazole, Imazalil, Iprodione, Kresoxim-methyl, Metconazole, Propiconazole, Pyrazophos, Pyrimethanil, Triadimenol, Trifloxystrobin, Vinclozolin, Zoxamide, Fosmet, Heptachlor-epoxide endo, HCH-delta, Isocarbophos, Isoprothiolane, Leptophos, Malathion, Mevinphos, Mirex, Nitrothal isopropyl, o,p-DDE, Oxadixyl, Paration, Pentachloroanisole, Procymidone, Profam, Profluralin, Pyridalyl, Silafluofen, Spinetoram, Spiromesifen, Spirotetramat-enol-glucoside, Spirotetramat-monohydroxy, Thiamethoxam, Trichloronate, Total heptachlor, Acephate, Total acylbenzolar-S-methyl, Amisulbrom, Anilophos,</p>

	<p>Azoxystrobin, Bentiavalicarb-isopropyl, Bioallethrin, Butocarboxim-sulfoxide, Cyazofamide, Cyhexatin, Clofentezine, Chromafenozide, Desmethrin, 2,6-dichlorobenzamide, Diclofluanid, Dicrotophos, Dimethachlor, Dimethoate, DMSA, EPN, Total heptachlor, Acephate, Total acylbenzolar-S-methyl, Anilophos, Azoxystrobin, Bentiavalicarb-isopropyl, Bioallethrin, Butocarboxim-sulfoxide, Cyazofamide, Cyhexatin, Clofentezine, Chromafenozide, Desmethrin, Diclofluanid, Dicrotophos, Dimethoate, DMSA, EPN, Fenmedifam, Fluopyram, Haloxypop-ethoxyethyl, Imidacloprid, Ioxynil, Propamocarb, Picoxystrobin, Pyraclostrobin, Tricyclazole, Thiophanate-methyl, Famophos, Phenoxycarb, Fenpyrazamine, Fenpropidine, TNFG, Iprovalicarb, Malaoxon, Metazachloro, Methraphenone, Methosulfamuron, Nicosulfuron, Oxidemeton-methyl, Pirimicarb, Propetamphos, Spinosad, Temephos, Terbufos Phorate-sulfone, Phosphamidon, Metaflumizone, Promecarb, Proquinazide, Prothioconazole, Prothioconazole-destio, Rotenone, Mepronil, Fenbutatin oxide, Imazalil, Indoxacarb, Iprobenfos, Methomyl, Methoxyfenozide, Monocrotophos, Omethoate, Propoxur, Triflumuron, Phosphamidon, Fenpiclonil, Fenpropimorph, Flufencin, Fluopicolide, Fluoxastrobin, Fluquinconazole, Flutolanil, Fluxapirosad, Metconazole, Triadimefon, Triflumizole, Ethoxyquin, Phenthion oxon sulphone, Phenthion sulfone, Phosthiazate, Endrin, Fenamiphos sulfoxide, Flucitrinate, Aldicarb sulfoxide, Disulfuton sulfoxide, Methiocarb sulfoxide, Fipronil, Paraoxon-methyl, Quintozeno, Aldicarb, Carbofuran, Disulfuton, Phorate, Methiocarb, Phenamidone, Phenhexamide, TNFA, Lufenuron, Mecarbam, Total milbemectin, Neburon, Nitempiram, Penthiopyrad, Pimetrozine, Piperonyl butoxide, Pyrafluene-ethyl, Total pyrethrins, Sebutylacin, Silthiofam, Simetryn, Tebufenpyrad, Thiofanox, Thiofanox-sulfoxide, Thiacloprid, Thiazopyr, Thiodicarb, Tolifluanid, Tricresyl phosphate, Trifloxyestrobil, Milbemectin A4, Acylbenzolar-S-methyl, Endosulfan beta, DEET, Heptenophos, Pyrethrin II, Prochloraz, Triflumizole FM-6-1, Acylbenzolar acid, Prochloraz Insecticidas: Vamidothion, Endosulfan alfa, Phosmet oxon, Endosulfan sulphate, Fenamiphos sulphone, Fipronil sulphone, Aldicarb sulphone, Disulfuton sulfone, Methiocarb sulphone, Fenthion sulfoxide, Total Parathion-methyl, Total Fenamiphos, Total Fipronil, Total aldicarb, Total carbofuran, Total disulfoton, total phorate, total oxydemeton-methyl, total sethoxydim, Milbemectin A3, Pyrethrin I, Phenthion oxon, Total DDT, Total Dieldrin, Total quintozene, Milbemectin A3, Heptachloro-epoxide exo</p>
<b>Otros</b>	<p>Biphenyl (puede aparecer como restos del uso de residuos orgánicos como fertilizantes), Forchlorfenuron (regulador del crecimiento vegetal)</p>

## M.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### M.4.1. Extracción de ADN de suelo

A partir de las muestras de suelo suelto y rizosférico, se extrajo ADN utilizando el kit *PowerSoil® DNA Isolation Kit* de QIAGEN, dentro de las 24 horas siguientes a la

toma de las muestras y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El protocolo se detalla a continuación:

- Pesar 0,25 g de muestra de suelo y añadir a un "Power Bead Tube". Agitar suavemente en un vórtex. Con este tampón, se dispersan las partículas de suelo, se disuelven los ácidos húmicos y se protegen los ácidos nucleicos de su degradación.
- Pipetear 60  $\mu\text{L}$  de solución C1 y se agita brevemente en vórtex. Esta solución contiene agentes que facilitan la lisis celular, como el SDS.
- Agitar los Power Bead Tubes debidamente cerrados durante 10 min a máxima velocidad. Con esto se completa la lisis celular y la homogenización tanto por la acción de los agentes químicos como por la agitación mecánica con las bolas de cristal contenidas en el tubo.
- Centrifugar a 10.000 g a temperatura ambiente durante 30 s.
- Conservar el sobrenadante (alrededor de 400-500  $\mu\text{L}$ ) en un tubo eppendorf. Este sobrenadante tiene un color oscuro y puede contener aún algunas partículas de suelo.
- Añadir 250  $\mu\text{L}$  de la solución C2. Agitar durante 5 s en vórtex e incubar a 4 °C durante 5 min. Con esta solución se consigue precipitar los compuestos orgánicos e inorgánicos que no sean el ADN, por ejemplo, restos celulares, proteínas o ácidos húmicos. Este paso es importante para asegurar la pureza del ADN extraído y conseguir una buena eficiencia en los siguientes pasos.
- Centrifugar los tubos a 10.000 g durante 1 min a temperatura ambiente.
- Transferir 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a un tupo eppendorf, evitando lo más posible arrastrar el precipitado.
- Añadir 200  $\mu\text{L}$  de solución C3 y agitar suavemente en vórtex. Posteriormente, incubar a 4 °C durante 5 min. Esta solución aumenta la pureza del ADN gracias a un agente precipitante adicional.
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min a temperatura ambiente.
- Transferir 750  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tupo eppendorf.
- Añadir 1,2 mL de la solución C4. Agitar en vórtex durante 5 s. Esta solución contiene una alta concentración de sales, lo que permite la unión del ADN a las

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

columnas de sílice de pasos siguientes. Así, se podrán descartar los componentes que no sean ADN puesto que no se unirán a la columna.

- Cargar 675  $\mu\text{L}$  dentro de la columna de gel de sílice (Spin Filter).
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min a temperatura ambiente.
- Descartar el eluido. Este procedimiento se repite 3 veces en la misma columna, de manera que se utilice todo el sobrenadante que contenía la solución C4.
- A la columna se añaden 500  $\mu\text{L}$  de solución C5 y se centrifuga a 10.000 g durante 30 s a temperatura ambiente. Esta solución permite limpiar la columna de sales y eliminar restos contaminantes que hayan podido quedarse unidos a la misma. Por lo tanto, se descarta el eluido de la centrifugación.
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min para eliminar el etanol residual que pueda quedar en la columna para que no interfiera con los siguientes pasos.
- Colocar la columna en un tubo eppendorf limpio y añadir 100  $\mu\text{L}$  de solución C6 en el centro de la misma.
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s a temperatura ambiente para eluir el ADN unido a la columna.
- Guardar el ADN extraído a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El rendimiento de la extracción y la calidad del ADN se confirmaron por dos métodos, por una parte, por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (p/v) teñidos con GelRed y visualizados bajo luz ultravioleta, así como usando un fluorímetro Qubit 3.0 (Life Technologies, Grand Island, NY).

### **M.4.2. Extracción de ADN de raíz**

Las raíces se trituraron en nitrógeno líquido y se utilizaron 100 mg de este tejido por cada repetición para extraer ADN, utilizando el Maxwell RSC (Rapid Sample Concentrator) con el kit 'PureFood GMO and Authentication' (Promega Biotech Ibérica S.L, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo seguido fue:

- Colocar 100 mg de raíz en el fondo de cada tubo de microcentrífuga.
- Añadir 1 mL de tampón CTAB a cada tubo.

- Añadir 20  $\mu\text{L}$  de solución de RNasa A y 40  $\mu\text{L}$  de solución de proteinasa K (PK) a cada tubo.
- Cerrar, invertir y agitar enérgicamente los tubos hasta que la muestra se resuspenda.
- Colocar en un bloque térmico a 65 °C durante 30 min.
- Mientras transcurre este tiempo de incubación, preparar los cartuchos RSC como se indica a continuación:
  - Colocar los cartuchos a utilizar en el Maxwell<sup>®</sup> RSC con el lado etiquetado en dirección opuesta al tubo de elución del tubo de elución. Presionar el cartucho hacia abajo para encajarlo en su posición.
  - Retirar con cuidado el precinto para que todo el plástico salga de la parte superior del cartucho. Hay que asegurarse de que se elimina toda la cinta de sellado y cualquier resto de adhesivo antes de colocar cartuchos en el instrumento.
  - Colocar un émbolo CSC/RSC en el pocillo nº 8 de cada cartucho. El pocillo nº 8 es el más cercano al tubo de elución.
  - Colocar los tubos de elución de 0,5 mL en la parte delantera de la gradilla de cartuchos Maxwell<sup>®</sup> RSC Cartridge Rack.
  - Añadir 100  $\mu\text{L}$  de tampón de elución en el fondo de cada tubo de elución.
- Después de la incubación, agitar en vórtex los tubos con el lisado para mezclarlo bien.
- Colocar los tubos con el lisado en una microcentrífuga y centrifugar a temperatura ambiente durante 10 min a 17.000 g para separar cualquier sólido y aceites.
- Añadir 300  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis al pocillo nº 1 del cartucho de reactivos.
- Transferir solo 300  $\mu\text{L}$  de muestra de lisado transparente al pocillo #1 del cartucho de reactivos. Evitar pipetear cualquier material sólido del fondo del tubo o en la superficie del líquido. Evitar también el aceite en la superficie. La transferencia de estos materiales puede inhibir ensayos posteriores. Si esto ocurre, se puede transferir el lisado aclarado a un tubo nuevo y centrifugar para eliminar restos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Proceder a ejecutar el método en el instrumento Maxwell<sup>®</sup> RSC para la purificación del ADN.

### M.4.3. Extracción de ADN de semillas

Las semillas ya esterilizadas y congeladas se trituraron utilizando un mortero estéril. Tras esto, se siguió el protocolo de extracción señalado anteriormente para el caso de la raíz.

### M.4.4. Extracción de ADN de cultivo bacteriano

Para extraer ADN total de cultivos líquidos bacterianos, se usó el kit *RealPure genomic DNA extraction kit* (Durviz, S.L.U., España), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras crecer las bacterias toda la noche, se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 14.000 g durante 30 s. Para el caso de bacterias Gram +, debido a la dificultad para lisar su pared celular, se siguieron algunos pasos adicionales. Estos consistieron en resuspender el pellet obtenido en 540  $\mu$ L de EDTA 50 mM, añadir 60  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL) e incubar a 37 °C durante 60 min, seguido de una centrifugación a 14.000 g durante 2 min. Los siguientes pasos son comunes tanto para bacterias Gram + como Gram -. El pellet obtenido se resuspendió en 600  $\mu$ L de la solución de lisis. Los tubos fueron incubados a 80 °C durante 5 min para lograr la lisis celular.

Tras esto, se añadió 3  $\mu$ L de RNasa (10 mg/mL), se mezcló por inversión y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se añadió 300  $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas y se agitaron los tubos. Se centrifugaron a 14.000 g durante 5 min. En este paso se puede observar la formación del precipitado proteico.

Se prepararon tubos eppendorf con 600  $\mu$ L de isopropanol frío (4 °C) y a estos se transfirió el sobrenadante del paso anterior (que contiene el ADN). Los tubos se mezclaron por inversión. Se centrifugaron a 14.000 g durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 600  $\mu$ L de etanol frío al 70 % (v/v). Primero se mezcló por inversión y, para eliminar el etanol, se centrifugaron de nuevo a 14.000 g durante 2

min, descartando el sobrenadante. El ADN se secó dejando el tubo sobre un papel de filtro y se hidrató con 200  $\mu\text{L}$  de solución de hidratación.

### **M.4.5. Amplificación de ADN mediante PCR**

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Alemania). Para preparar las reacciones, se usó un kit comercial AccuStart™ II PCR ToughMix (Quantabio, Beverly, Estados Unidos). Este kit incluye una mezcla de reacción con la enzima Taq ADN polimerasa, el tampón para dicha enzima, una solución con magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), además de los dNTPs y una serie de aditivos y estabilizadores. De esta manera, solo hay que adicionar los primers (cebadores) deseados, el ADN molde y el agua MilliQ para alcanzar el volumen de reacción final. En este caso, el volumen final de reacción siempre fue de 25  $\mu\text{L}$ . De esta manera, se añadían 9,5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción del kit, 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (partiendo de primers a 10  $\mu\text{M}$ ), 12,5  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ y 1  $\mu\text{L}$  de ADN (de la muestra a analizar).

Las condiciones de PCR variaron según las regiones a amplificar. Así, tanto los primers usados como las respectivas condiciones de reacción empleadas se detallan a continuación en la Tabla M3.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla M3. Primers usados para la amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR.** Se indican los primers utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR con diferentes aproximaciones, sus secuencias y referencias, así como las condiciones de PCR empleadas. Así mismo, se muestran las condiciones de qPCR empleadas para cuantificar los genes 16S rRNA y 18S rRNA y los primers empleados.

Aproximación	Primers (forward y reverse)	Secuencia (5'-3')	Condiciones de PCR		
			Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Amplificación universal	9bfm <sup>a</sup> 1512uR <sup>a</sup>	GAGTTTGATYHTGGCTCAG ACGGHTACCTTGTTACGACTT	1 30 1	{ 94 94 52 72 72	5 min 30 s 30 s 1,5 min 5 min
Amplificación específica del género <i>Actinophytocola</i>	AphyF1 AphyR1	GGGTTTGACATGCACCAGACAT CCACCTCACGGTCTCGCAA	1 30 1	{ 94 94 61 72 72	5 min 30 s 30 s 1,5 min 5 min
Amplificación específica de la especie <i>Actinophytocola oryzae</i>	AphyF2 AphyR2	GATTCTCGCATGGGGATTGG GCTACGGCACGGAAACCGT	1 30 1	{ 94 94 61 72 72	5 min 30 s 30 s 1,5 min 5 min
Primer paso de la PCR anidada para secuenciación masiva en muestras de semilla	63UF <sup>b</sup> 1115UR <sup>c</sup>	CAGGCCTAACACATGCAAGTC AGGGTTGCGCTCGTTG	1 25 1	{ 95 95 52 72 72	5 min 30 s 30 s 1,5 min 5 min
qPCR para cuantificación del número de copias del gen 16S rRNA	27UF <sup>d</sup> 341UR <sup>d</sup>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CTGCTGCCTCCCGTAGG	1 40	{ 95 95 63 72	30 s 30 s 30 s 30 s

qPCR para cuantificación del número de copias del gen <i>18S rRNA</i>	FR1 <sup>e</sup> FF390 <sup>e</sup>	AICCATTCAATCGGTAIT CGATAACGAACGAGACCT	1 40	{ 95 95 56 72	30 s 30 s 30 s 30 s
qPCR para cuantificación del número de copias del gen <i>18S rRNA</i> de arqueas	344aF <sup>f</sup> 517UR <sup>f</sup>	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA GWATTACCGCGGCKGCTG	1 40	{ 95 95 62 72	5 min 15 s 30 s 30 s

<sup>a</sup>Mühling et al., 2008

<sup>b</sup>Marchesi et al., 1998

<sup>c</sup>Anguita-Maeso et al., 2022

<sup>d</sup>Shiu et al., 2018

<sup>e</sup>Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011

<sup>f</sup>Müller et al., 2015

#### M. 4.5.1. Amplificación de ADN mediante PCR anidada

Para la secuenciación del ADN extraído de muestras de semilla, se llevó a cabo una PCR anidada. Este método consiste en la realización de una PCR inicial con primers que cubran una extensión mayor del gen a amplificar. Así, al realizar una segunda PCR (en este caso, la realizada en el servicio de secuenciación) se aumenta la especificidad para la amplificación del gen deseado. En el caso de las semillas, este protocolo fue útil para reducir la amplificación de ADN procedente de plastos de la planta.

Las condiciones de PCR así como los primers utilizados se detallaron en la Tabla M3. La mezcla para la PCR fue igual a la mencionada en el apartado anterior, a excepción de que se aumentó el volumen de muestra añadiendo 2 µL, por lo que se disminuyó el volumen de agua MilliQ a 11,5 µL para mantener el volumen final de 25 µL. La concentración de ADN medida con fluorímetro Qubit de las muestras utilizadas variaba entre 1,85 y 42,6 ng/µL.

### M.4.6. Electroforesis de ADN

La electroforesis horizontal en geles de agarosa no desnaturalizantes fue usada para comprobar la amplificación del ADN por PCR y la calidad de las extracciones de ADN total. La calidad se consideró adecuada si no se observaban pequeños fragmentos de ADN en el gel. Los geles se preparaban con un porcentaje de agarosa que variaba según el tamaño a visualizar (0,8 % o 1,5 % v/v). La agarosa se disolvía en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2 mM y ácido acético 0,114 % (v/v) a un pH 8,5). El volumen de carga habitual fue de 5 µL de muestra más 1 µL de tampón de carga 6 veces más concentrado, compuesto por glicerol 50 % (v/v), Orange G 0,5 % (p/v) y EDTA 10 mM, con un pH final de 8. Como marcadores de peso molecular, se usó el marcador  $\phi$ 29 (compuesto por el genoma del fago con el mismo nombre digerido con la enzima de restricción *HindIII*). La electroforesis se realizó en tampón TAE con una intensidad de corriente de 10 V/cm.

El revelado de los geles se llevó a cabo mediante la inmersión del gel en una solución para tinción de ácidos nucleicos con GelRed™ (100 µL/L) de Biotium Incorporation (EEUU) durante 45-60 min. Tras este período de incubación, se visualizaban mediante la exposición a luz ultravioleta (365 nm de longitud de onda). Para la visualización y toma de fotografías se usó el sistema de documentación Gel printer y Gelstation (Tecnología para Diagnóstico e Investigación TDI, España), así como un GelDoc Go Imaging System (BioRad, California, Estados Unidos).

### M.4.7. Purificación de productos de PCR

El uso de productos de PCR en aplicaciones posteriores, como la secuenciación Sanger, requiere de su purificación para la eliminación de componentes que puedan interferir con las subsecuentes reacciones (tampones, enzimas, sales, ADN molde...).

Esta purificación, en la mayoría de los casos, se llevó a cabo mediante el uso de columnas comerciales Illustra™ MicroSpin™ S-300 HR Columns (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos). El protocolo empleado fue el recomendado por la empresa y consistía en:

- Resuspender la resina mediante vórtex.

- Abrir un cuarto el tapón de las columnas y retirar la pletina de plástico de la parte inferior de las mismas.
- Colocar en tubos recolectores y centrifugar durante 1 min a 730 g.
- Descartar el eluido, retirar el tapón y cargar la muestra a purificar.
- Centrifugar durante 2 min a 730 g. El eluido corresponde con el producto limpio de PCR.

En determinados casos, se observó que, tras la amplificación mediante PCR, se veían varias bandas en los geles de agarosa. Si estas muestras se limpian con columnas S-300, esas otras bandas se eluyen junto con el producto de interés y pueden interferir en la secuenciación. De esta manera, en estos casos el mejor abordaje es realizar una purificación a partir de la extracción de la banda de amplificación con el tamaño deseado del propio gel.

Este procedimiento se llevó a cabo usando el kit Illustra™ GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos). En primer lugar, las bandas que se iban a usar para purificación fueron cortadas del gel mediante un bisturí limpio y estéril, asegurándose de que el tiempo de exposición a la luz UV fuera reducido para evitar mutaciones en el ADN. El fragmento de agarosa cortado se añadía en tubos eppendorf que habían sido previamente pesados. Se pesaban de nuevo para conocer el peso de la banda. A partir de aquí, el protocolo seguido fue el recomendado por la empresa suministradora del kit y se detalla a continuación:

- Añadir al eppendorf con la agarosa cortada la cantidad correspondiente de tampón de captura 3 (10 µL por cada 10 mg de fragmento). Este desnatura las proteínas y disuelve la agarosa. Mezclar los tubos por inversión e incubar a 60 °C durante 15-20 min, hasta que la agarosa se disuelva completamente.
- Preparar una columna GFX sobre un tubo colector (una por muestra). Cargar hasta 800 µL de la muestra ya tratada con el tampón 3.
- Incubar durante 1 min a temperatura ambiente (para la unión del ADN a la resina).
- Centrifugar a 16.000 g durante 30 s.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Descartar el eluido y colocar las columnas en un nuevo tubo colector.
- Añadir 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado 1 para eliminar sales.
- Centrifugar a 16.000 g durante 30 s.
- Descartar el eluido y colocar las columnas en tubos eppendorf limpios.
- Añadir 30  $\mu\text{L}$  de tampón de elución 6 (es agua libre de DNAsas).
- Incubar durante 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 16.000 g durante 1 min.
- Conservar el eluido, que corresponde con el ADN purificado de banda.

### M.4.8. Medida de concentración de ADN

El fluorímetro Qubit® 3.0 y el kit comercial Qubit® dsADN HS (High Sensitivity) Assay kit (Invitrogen-Life technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos) permiten la cuantificación de la concentración de ADN de doble cadena con un alto nivel de sensibilidad. Esta cuantificación se llevó a cabo gracias a las recomendaciones del fabricante, tal y como sigue.

Preparar una solución que contenga el fluoróforo con el tampón proporcionado por el kit, en una proporción 1:200. El volumen final por muestra debe ser de 200  $\mu\text{L}$ . Se preparó un stock de esta solución y, a partir de este, se prepararon las soluciones de referencia para el calibrado del aparato. Estos estaban compuestos por 10  $\mu\text{L}$  del patrón en 190  $\mu\text{L}$  de la solución con fluoróforo. Se mezcló durante 2-3 s en vórtex. Para las muestras, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de cada una a 199  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo y fueron igualmente mezcladas por vórtex. Se dejó incubar 2 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se calibró el aparato con el patrón incluido en el propio kit y posteriormente se midieron las muestras.

### M.4.9. Secuenciación de ADN

#### M.4.9.1 Secuenciación mediante técnica Sanger

La secuenciación mediante la técnica Sanger se llevó a cabo para la determinación del género bacteriano de las colonias obtenidas durante los aislamientos.

Para este caso, se secuenció tan solo desde un extremo del gen ribosomal *16S rRNA*, en concreto, usando el primer *9bfm* (Tabla M3). Para la caracterización de las cepas de interés que se almacenaron en criotubos con glicerol al 22,5 %, se realizó una secuenciación por ambos extremos (incluyendo también el primer *1512uR* (Tabla M3). La secuenciación se realizó gracias a los servicios de la Unidad de Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC; Granada, España). En primer lugar, los productos de PCR fueron purificados tal y como se indica en el Apartado M.4.7. Tras esto, se añadía a tubos de PCR la cantidad de muestra adecuada para obtener alrededor de 20-80 ng de ADN, así como la cantidad correspondiente de primer para obtener una cantidad final 6,4 pmol y el volumen restante de agua MilliQ, para alcanzar un volumen final de 12  $\mu$ L.

### **M.4.9.2 Secuenciación masiva con la tecnología MiSeq de Illumina**

Para la caracterización de las comunidades bacterianas y fúngicas presentes en los distintos tipos de muestras analizadas, se utilizó la metodología de secuenciación masiva de la plataforma MiSeq de Illumina mediante los métodos PE (paired-end) 2x300 y PE 2x275. Esta secuenciación se llevó a cabo íntegramente en los servicios de la Unidad de Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC; Granada, España). Tan solo en el caso de las muestras de semillas de olivo, se llevó a cabo un paso de PCR previa en nuestros laboratorios, siguiendo lo especificado en el Apartado M.4.5.1. Esta tecnología permite la obtención de lecturas de una longitud máxima de 300 pb o 275 pb (según el método usado). Las regiones que se secuenciaron con esta técnica fueron las regiones hipervariables V3-V4 del gen *16S rRNA* (cuya longitud oscila entre 433 y 483 pares de bases, aproximadamente) (Vargas-Albores et al., 2017), para procariotas y la región intergénica entre los genes ribosomales *5,8S* y *23S rRNA*, llamada ITS2, cuya longitud media es de 187 pares de bases (R. H. Yang et al., 2018), para eucariotas. Por ello, para obtener la secuencia completa de la región amplificada, se realiza la secuenciación de las dos hebras complementarias del mismo amplicón, siendo necesario un solapamiento de al menos 12 pares de bases para la reconstrucción posterior de las secuencias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Para la construcción de la librería procariótica, se emplearon los primers Pro341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3') y Pro805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') (Takahashi et al., 2014). En el caso de la librería eucariótica, se amplificó la región intergénica ITS2 usando los primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) y ITS7 (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3') (Ihrmark et al., 2012).

Durante el procesamiento de las muestras, en el servicio de secuenciación, se añadieron unas secuencias únicas de ADN adaptadoras conocidas como *barcodes* o MID (multiplex identifier) con el fin de poder identificar las muestras tras la secuenciación (ya que se hace un pool de las mismas). Así, los resultados de secuenciación se obtenían ya con el nombre de la muestra adecuado.

En la tecnología MiSeq, la secuenciación da lugar a una serie de clústeres con moléculas de ADN de secuencia similar (debido a la secuenciación “en puente” que se lleva a cabo). Estos clústeres se monitorizan y facilitan la detección de la señal y de errores de secuenciación. Esto puede ser problemático si las muestras a secuenciar presentan poca diversidad en su secuencia, como es el caso de regiones conservadas, tal y como ocurre con en los genes ribosomales *16S rRNA* y *18S rRNA*. Por ello, para aumentar la variabilidad, se añade ADN de secuencia conocida del virus Phi-X174, permitiendo aumentar el contraste entre clústeres (Krueger et al., 2011).

Un problema planteado al secuenciar el gen ribosomal *16S rRNA* es la posible amplificación de secuencias de ADN procedente de plastos y mitocondrias de la planta. Para minimizar esta amplificación, se incorporan secuencias de ácido peptidonucléico (PNA) que presentan una estructura muy similar a la del ADN pero que impiden la elongación por parte de la polimerasa. Estos PNAs se diseñan de manera que sean específicos para los genes *16S rRNA* de las organelas de las células eucariotas, reduciendo la amplificación de genes ribosomales no microbianos (Lundberg et al., 2013). Estos PNAs fueron añadidos en la empresa de secuenciación y, en el caso de las muestras de semilla, la concentración se aumentó 4 veces respecto al procedimiento habitual para muestras de endófitos de las raíces.

### M.4.10. Diseño de primers específicos para *Actinophytocola* y puesta a punto de la PCR

Se diseñaron dos pares de primers con diferentes especificidades, cuyas secuencias se pueden encontrar en la Tabla M3. En concreto, el par AphyF1 y AphyR1 fue específico del género *Actinophytocola*, mientras que el par AphyF2 y AphyR2 fue específico de la especie *Actinophytocola oryzae*. El par de primers AphyF1/AphyR1 se diseñó usando la base de datos de Decipher (<http://www2.decipher.codes/index.html>), que incluye primers ya diseñados para el gen ribosomal *16S rRNA* de bacterias y arqueas. En su web, se accede al apartado de *oligo design* y se selecciona el género deseado. Se obtienen una serie de pares de primers y se obtiene información de la especificidad de los mismos. Además, la especificidad de los primers también se analizó *in silico* con la herramienta RDP (Cole et al., 2014). Según el análisis realizado en RDP, este set de primers alinea con varias especies del género *Actinophytocola* (*oryzae*, *timorensis*, *xinjiangensis* y *corallina*), además de con *Pseudonocardia yuanmonensis* (género de la misma familia que *Actinophytocola*). Esta comprobación de la especificidad también se llevó a cabo mediante la herramienta de diseño de primers del NCBI (J. Ye et al., 2012), alineando con los géneros *Amycolatopsis*, *Gordonia*, *Streptomyces* y *Pseudonocardia*.

El par de primers AphyF2/AphyR2 se diseñó con una funcionalidad diferente de Decipher. En este caso, se le proporciona un documento con la alineación de secuencias del gen ribosomal *16S rRNA* de diferentes especies de *Actinophytocola*. Se indica la especie que se quiere seleccionar para que los primers sean específicos para ese gen. La especie seleccionada en este caso fue *Actinophytocola oryzae*, ya que se comprobó que los ASVs de *Actinophytocola* encontrados en esas muestras correspondían potencialmente a esta especie (lo que se realizó con la herramienta BLASTn del NCBI). Se verificó la especificidad de los mismos con los métodos *in silico* mencionados anteriormente y se obtuvo que era específico de *Actinophytocola oryzae*.

Para poner a punto la temperatura de anillamiento de la PCR, se calculó por una parte la longitud esperada del fragmento (287 y 658 pb) y la posible temperatura de anillamiento (con herramientas online como TM calculator,

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

<https://tmcalculator.neb.com/>). La temperatura calculada con esta herramienta fue de 60 °C. Se realizó una PCR en gradiente, con las temperaturas variando desde 50 °C hasta 61,9 °C. En cada temperatura se incluyeron muestras de diferentes géneros bacterianos, para comprobar la especificidad a cada temperatura. Estas muestras incluyeron ADN genómico de *Actinophytocola oryzae* (control positivo), *Escherichia coli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Gordonia* y *Streptomyces*. Los productos de PCR se visualizaban en un gel de agarosa al 0,8 %. El resultado final fue que a la temperatura de 61 °C se obtuvo el mejor resultado, puesto que no se observaban amplificaciones de otros géneros bacterianos para ambos pares de primers.

### **M.4.11. Clonación de fragmentos de ADN en plásmido y extracción de ADN**

La clonación de fragmentos de ADN en plásmidos se realizó para la obtención de curvas patrón que se usaron en los experimentos de PCR cuantitativa (qPCR). En concreto, se cuantificaron tanto la biomasa bacteriana y fúngica como de arqueas. Para el caso de la biomasa bacteriana, se contaba con una cepa con el plásmido clonado preparado anteriormente en nuestro grupo de investigación. En concreto, se trataba de un plásmido pGEM-T Easy (Promega) ligado con el gen ribosomal *16S rRNA* de *Bradyrhizobium* sp. GV102, desde la posición 9 a la 1512 (Medina et al., 2020) e incorporado en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Esta cepa se encontraba almacenada en criotubos con glicerol a -80 °C. Se creció en medio LB líquido suplementados con ampicilina a una concentración final de 20 mg/mL durante toda la noche. Al día siguiente se llevó a cabo una extracción del ADN plasmídico mediante el uso del kit mi-Plasmid Miniprep de Metabion International AG (Planegg, Alemania), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, el cual incluía los siguientes pasos:

1. Crecer un cultivo líquido bacteriano que contenga el plásmido de interés en medio LB con el(los) antibiótico(s) apropiados durante 12-16 horas con agitación vigorosa en un agitador orbital a 170 r.p.m a 37 °C.
2. Centrifugar el cultivo durante 1-2 minutos a 10.000 g. Desechar el sobrenadante y eliminar todo el medio residual con una pipeta.

3. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de tampón MX1 (que incluya la RNAsa) al pellet obtenido y resuspender completamente las células mediante agitación o pipeteo. No deben quedar grumos celulares visibles después de la resuspensión.
4. Agregar 250  $\mu\text{L}$  de tampón MX2 y mezclar suavemente para lisar las células, invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces hasta que desaparezca la turbidez. Incubar a temperatura ambiente durante 1-5 minutos. Es importante no utilizar vórtex, ya que puede dañar el ADN.
5. Añadir 350  $\mu\text{L}$  de tampón MX3 para neutralizar el lisado y mezclar la solución inmediatamente con suavidad. Debería observarse un precipitado blanco.
6. Centrifugar a 10.000 g durante 5-10 minutos, al mismo tiempo, colocar una Mini Columna sobre un tubo de recolección.
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a la columna.
8. Centrifugar a 7.000 g durante 30-60 segundos. Desechar el efluído.
9. Lavar la columna una vez con 0,5 ml de tampón WN centrifugando a 7.000 g durante 30-60 segundos. Desechar el efluído.
10. Lavar la columna una vez con 0,7 ml de tampón WS mediante centrifugación a 7.000 g durante 30-60 segundos. Desechar el efluído.
11. Centrifugar la columna a 10.000 g durante otros 3 minutos para eliminar el etanol residual. Es importante eliminar el etanol residual ya que puede inhibir reacciones enzimáticas posteriores.
12. Colocar la columna en un nuevo tubo de centrifugación de 1,5 ml. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de tampón de elución en el centro de la membrana. Para una elución efectiva, es importante que la solución de elución se dispense en el centro de la membrana y se absorba completamente.
13. Dejar la columna en reposo durante 2-3 minutos y centrifugar a 10.000 g durante 2-3 minutos para eluir el ADN.
14. Almacenar el ADN a corto plazo (hasta algunas semanas) a 4 °C; a largo plazo, almacenar a -20 °C.

Posteriormente, el ADN fue cuantificado mediante fluorimetría con Qubit 3.0 (Apartado M.4.8) para poder calcular el número de copias de las diferentes diluciones de la curva patrón.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Para las curvas de calibración de la comunidad fúngica, el gen *18S rRNA* de *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) (Herrera-Medina et al., 2007) se clonó en el plásmido pGEM-T Easy utilizando los primers Euk6-23 (5'-GGTTGATYCTGCCAGTAG-3') y REuk1755-1772 (5'-AAGTCGTAACAAGGTWKC-3') (Y. Wang et al., 2014). En primer lugar, se extrajo el ADN de la cepa indicada (Apartado M.4.4) y se llevó a cabo una PCR en gradiente para determinar la mejor temperatura de anillamiento de estos primers (Apartado M.4.5). La temperatura óptima fue de 60 °C. Con el producto de PCR de esta temperatura, se comenzó el proceso de ligación y clonación en *E. coli* DH5 $\alpha$ , como se detalla a continuación:

- Se preparó la mezcla de ligación utilizando el kit comercial pGEM-T Easy Vector System de PROMEGA (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), para conseguir la unión del fragmento de ADN amplificado con el plásmido seleccionado. En esta solución se incluyeron 2  $\mu$ L del producto de PCR, 5  $\mu$ L del tampón de la ligasa, 1  $\mu$ L de la enzima T4 ligasa, 1  $\mu$ L de plásmido y 1  $\mu$ L de agua MilliQ.
- La ligación se dejó incubar a 4 °C durante toda la noche.
- Con este producto de ligación se transformaron células competentes por RbCl de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las células se tomaron de su almacenaje a -80 °C y se incubaron 15 min en hielo para permitir una descongelación paulatina y evitar dañarlas.
- A este tubo de células competentes (con un volumen de 50  $\mu$ L) se añadió 5  $\mu$ L de la ligación, se mezcla suavemente por inversión y se incuba en hielo durante 25-30 min.
- Se aplica un choque térmico en Thermoblock a 42 °C durante 1 min 30 s.
- Inmediatamente se vuelve a dejar en hielo 5 min.
- Añadir 900  $\mu$ L de LB (en esterilidad) e incubar a 37 °C durante 1 hora, dejando el tubo tumbado para facilitar la oxigenación.
- Sembrar el producto de la transformación en tres placas de LB suplementadas con ampicilina (20 mg/mL) y X-Gal (40  $\mu$ g/mL). La ampicilina permite seleccionar las bacterias que presenten el plásmido, ya que este presenta un gen de resistencia a este antibiótico que no está presente en el genoma bacteriano. Además, el X-Gal permite diferenciar las colonias donde se encuentre insertado en el plásmido nuestro gen de interés. El plásmido pGEM-T Easy contiene un

lugar de clonaje dentro del operón *lac*. De esta manera, si el fragmento de ADN deseado se ha introducido en el lugar de clonaje, impide la expresión del gen *lacZ* y, por tanto, no se sintetizará la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima hidroliza el X-Gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, que es oxidado generando un compuesto azul insoluble. De esta forma, las colonias correctamente transformadas y con el gen recombinante, no expresarán esta enzima y carecerán de color azul, mostrando un color blanquecino.

- Las placas sembradas se dejan incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Las colonias blancas se repican con palillos estériles en placas LB con ampicilina (20 mg/mL).
- Se llevó a cabo una PCR sobre 10 de estas colonias con los primers que fueron usados posteriormente en la qPCR (FF390 y FR1, con secuencias 5'-CGATAACGAACGAGACCT-3' y 5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3', respectivamente) (Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011), así como los usados para la clonación, y se visualizó en geles de agarosa para comprobar que el inserto presentaba el tamaño correcto.
- De estas 10 colonias, dos fueron crecidas en LB líquido con ampicilina (20mg/mL) y fueron guardadas en criotubos con glicerol a -80 °C.

Se extrajo ADN plasmídico de uno de estos clones tal y como se indicó anteriormente y se cuantificó con Qubit 3.0. A partir de este ADN, también se llevó a cabo una comprobación mediante digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción. En concreto, se utilizó la enzima *notI* cuyo lugar de corte se encuentra en el *multicloning site* (MCS) del vector y no tiene diana en nuestro gen de interés. Se preparó la reacción de digestión añadiendo 0,5  $\mu$ L de enzima (5 U/  $\mu$ L), 1  $\mu$ L de ADN plasmídico, 1  $\mu$ L de tampón CutSmart® de New England BioLabs (Heidelberg, Alemania) para enzimas de restricción y 7,5  $\mu$ L de agua MilliQ. La resolución en gel de agarosa de esta digestión mostró dos bandas con las longitudes esperadas (una banda con la longitud del inserto y otra con la longitud restante del plásmido).

Por último, para el caso de arqueas, se llevó a cabo el mismo procedimiento que para el caso de hongos, con la excepción de los primers utilizados (ver Tabla M3) y que el fragmento no fue clonado desde ADN total de un aislado, sino que se obtuvo a partir

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

del ADN total extraído de una muestra de suelo con abundante cantidad de arqueas detectado por secuenciación masiva y qPCR.

### **M.4.12. Cuantificación de ADN mediante PCR cuantitativa**

Todas las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo con QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Alcobendas, España), usando los reactivos de Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, Francia). A este mix se le añadió un control de error de pipeteo contenido en el kit, llamado ROX. Este se añadió en una cantidad menor a la indicada por el fabricante, ya que generaba demasiada fluorescencia en comparación a las muestras. En concreto, se añadieron 2 µL de High-ROX al mix comercial, se mezcló bien y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf opacos. Los resultados de las qPCR fueron analizados con QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.2 (Applied Biosystems™, Alcobendas, España). Las reacciones tuvieron un volumen final de 10 µL conteniendo 5 µL de TB Green Premix, 0,5 µL de cada primer (10 µM), 3 µL de agua MilliQ y 1 µL de ADN a distintas concentraciones que se detallan en el siguiente apartado. Para el caso de arqueas, estas cantidades variaron para los primers y el agua: 0,4 µL de cada primer (a 5 µM) y 3,2 µL de agua MilliQ.

#### **M.4.12.1. Cuantificación de biomasa bacteriana**

La cuantificación del número de copias del gen *16S rRNA* se llevó a cabo según lo descrito por Medina y colaboradores (2020). Debido a que este proceso ya había sido puesto a punto en nuestro laboratorio, solo fue necesario ajustar la concentración de ADN molde adecuada, las diluciones de la curva patrón y hacer un test de inhibición (Medina et al., 2020).

Para determinar la concentración de las muestras a usar, se escogieron las cuatro muestras de rizosfera con mayor concentración de ADN. De cada muestra se hicieron cuatro diluciones, de manera que se obtuvieran concentraciones de 1, 0,5, 0,1 y 0,01 ng/µL. Además, en esta misma placa, se incluyó el ensayo de inhibición. Este ensayo se basa en la cuantificación de un gen de resistencia a kanamicina presente en un plásmido.

Este es usado debido a su escasa presencia en muestras ambientales, ya que esto podría enmascarar el efecto inhibitorio de las muestras. Así, se incluyeron tres réplicas técnicas incluyendo ADN de este plásmido a  $10^7$  copias. Con estas muestras se puede conocer la amplificación sin inhibición. Para estudiar el efecto inhibitorio de nuestras muestras, se añadieron tres réplicas de cada una de las cuatro concentraciones usadas añadiéndole a cada una 1  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico. Por último, también se incluyeron varias diluciones a partir del ADN plasmídico usado como patrón, para poder seleccionar el rango de concentraciones donde se capturaba la variabilidad de nuestras muestras. Para calcular el número de copias que tenía el plásmido control, se necesitó conocer la concentración de ADN y el tamaño del inserto, siguiendo la Fórmula 1:

$$\frac{\text{cantidad DNA (ng)} \times \text{número de avogadro } \left(\frac{\text{moléculas}}{\text{mol}}\right)}{\text{longitud del inserto} \times \text{masa media de un par de bases} \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1 \cdot 10^9 \text{ ng/g}} \quad \text{Fórmula 1,}$$

donde el número de Avogadro corresponde con  $10^{23}$  *moléculas/mol* y la masa media de un par de bases corresponde con  $660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ .

Con esto se pudo conocer el número de copias de cada dilución, de manera que se hizo una curva patrón que sirvió para calcular el número de copias de las muestras.

Finalmente, se escogió la concentración de 0,5 ng/ $\mu\text{L}$  como la óptima y todas las muestras fueron diluidas a esta concentración. Además, no se detectó inhibición según el ensayo de kanamicina. Las condiciones de qPCR empleadas están indicadas en la Tabla M3. En cada placa de qPCR, se incluyeron tres réplicas técnicas, tanto de las muestras a analizar como de la curva patrón, cambiando de punta para cada pipeteo. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

### M.4.12.2. Cuantificación de biomasa fúngica

En el caso de la cuantificación del número de copias del gen ribosomal *18S rRNA*, fue necesario poner a punto las condiciones del experimento al ser la primera vez que se realizaba en nuestro laboratorio. Por ello, en primer lugar, fue necesario conocer la temperatura de anillamiento de los primers FF390/FR1, Tabla M3) (Chemidlin Prévost-

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Bouré et al., 2011) usados bajo las condiciones de estudio. De esta forma, se llevó a cabo una PCR en gradiente utilizando temperaturas desde 50 hasta 65 °C. Se incluyó el ADN plasmídico con el gen *18S rRNA* clonado en diez diluciones seriadas, bajando el número de ciclos a 22. Con esto se podían acotar las mejores temperaturas para ser probadas en la qPCR, donde sólo se pueden usar tres temperaturas diferentes por experimento. Según el resultado obtenido, se probaron las temperaturas de 56, 58 y 60 °C en la qPCR. En cada temperatura se incluyeron ocho diluciones del patrón, así como las cuatro muestras citadas en el apartado anterior y en dos concentraciones (0,5 y 0,05 ng/μL). No fue necesario realizar de nuevo el ensayo de inhibición, ya que se trataba de las mismas muestras. Finalmente, la temperatura óptima de anillamiento fue la de 56 °C, por presentar una mayor eficiencia en la reacción y la concentración que presentó amplificación en rangos comparables a la curva patrón fue la de 0,05 ng/μL. El diseño de cada placa, así como el número de réplicas, fue el mismo que el realizado para el caso de bacterias (Apartado M.4.12.1)

### M.4.12.3. Cuantificación de biomasa de arqueas

Para la cuantificación del número de copias del gen *16S rRNA* de arqueas en semillas, se usaron los primers 344aF y 517uR (Tabla M3) (Müller et al., 2015), los cuales han sido previamente usados para la cuantificación de arqueas en semillas de otras especies vegetales (Taffner et al., 2020; Wassermann, Cernava, et al., 2019). Aunque se siguieron las recomendaciones de estos autores (en cuanto a volumen de reacción y condiciones de la qPCR), se quiso comprobar la temperatura de anillamiento por las posibles variaciones entre aparatos y reactivos. Se comprobó la temperatura de anillamiento anteriormente descrita para este protocolo (60 °C) y variaciones de dos grados sobre la misma (58, 60 y 62 °C), introduciendo seis diluciones de la curva patrón. La temperatura a la que se obtuvo una mejor eficiencia fue la de 62 °C.

Tras esto, se realizó un ensayo para comprobar la posible inhibición de la reacción por parte de las muestras, así como para comprobar el rango de concentraciones de las mismas. Se eligieron las cuatro muestras (provenientes de cuatro genotipos diferentes de olivo) con mayor concentración de ADN. Debido a que la

concentración de ADN no variaba mucho entre muestras, se decidió usarlas sin igualar las concentraciones entre ellas. De esta manera, en este ensayo se incluyeron las muestras sin diluir y diluidas 10 veces con tres réplicas técnicas, así como tres réplicas añadiendo el plásmido con el gen de resistencia a kanamicina. También se incluyeron seis diluciones de la curva patrón para comprobar si las muestras amplificaban dentro de este rango.

En este ensayo, se observó que no había inhibición y que las muestras diluidas 10 veces podían ser usadas adecuadamente. Se procedió a realizar el experimento final donde se incluyeron 2 muestras de cada genotipo (una por árbol) por triplicado. En este experimento, también se incluyeron muestras de suelo con una abundancia relativa de arqueas detectable por secuenciación masiva, procedentes del estudio publicado por Lasa y colaboradores (2023), a modo de controles positivos de la amplificación. Cada muestra seleccionada mostró una abundancia relativa mayor en diferentes phyla de arqueas:

- **CNP 3.1.** Esta muestra fue la más rica en *Archaea*, con una abundancia relativa del 0,93 %. Además, fue la más rica en el phylum *Euryarchaeota* (abundancia relativa del 0,8 %).
- **CNP 3.2.** Fue la muestra más rica en el phylum *Pacearchaeota* (abundancia relativa de 0,27 %).
- **CNR 1.2.** Fue la segunda muestra más rica en *Archaea* (abundancia relativa del 0,61 %).
- **CNR 2.2.** Fue la muestra más rica en el phylum *Thaumarchaeota* (abundancia relativa del 0,51 %).

Tras realizar esta qPCR, los productos generados fueron comprobados en una electroforesis con gel de agarosa (1 %).

### M.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO

#### M.5.1. Procesamiento de secuencias obtenidas por secuenciación Sanger.

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger (Apartado M.4.9.1) para la identificación preliminar de los géneros bacterianos fueron analizadas con el software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, EEUU). Cada secuencia viene asociada con un electroferograma donde se puede observar la calidad de la secuenciación según la nitidez de la señal asociada a cada base y la separación entre la detección de las mismas. Los primeros y últimos nucleótidos de la secuencia eran eliminados por tener una menor calidad (superposición de las señales). Los demás errores o ambigüedades observados fueron corregidos manualmente. Para conocer el género bacteriano al que pertenecían, las secuencias finales se enfrentaron a la base de datos NR/NT del NCBI mediante la herramienta online de BLASTn.

Para la clasificación de las secuencias casi completas del gen ribosomal *16S rRNA*, dichas secuencias fueron analizadas y ensambladas utilizando el software Geneious Prime 2022.0.1 (<http://www.geneious.com>). En primer lugar, las secuencias reversas tuvieron que ser modificadas para obtener la reversa complementaria, usando las opciones *Sequence>Reverse complement*. Tras esto, se usó la herramienta *De novo assembly* (dentro del apartado *Align/Assembly*), con las condiciones por defecto (usando el ensamblador de Geneious con la sensibilidad en *Medium sensitivity/Fast*), para solapar las secuencias directa y reversa. Seguidamente, se analizaron manualmente las ambigüedades en los ensamblados gracias a que Geneious muestra también el electroferograma de ambas secuencias. Una vez las secuencias directa y reversa fueron ensambladas, para un mismo género bacteriano, las secuencias de los diferentes aislados fueron alineadas con el fin de calcular la similitud entre ellos basada en la secuencia de su gen ribosomal *16S rRNA*. Esto se realizó con la opción de *Multiple alignment* dentro del menú de *Align/Assembly*, utilizando las opciones por defecto de alineamiento según Geneious. Con esta información se pudieron clasificar las secuencias en diferentes grupos, según el porcentaje de similitud entre ellas. Aquellas secuencias

con más de un 99 % de identidad se incluyeron en un mismo grupo. Por último, se pudo comprobar de nuevo el género bacteriano, en este caso ya con la secuencia casi completa del gen, gracias a la implementación de BLASTn en Geneious.

Con el objetivo de aproximar la clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas, se realizaron análisis de árboles filogenéticos incluyendo cepas tipo de cada género estudiado. Este análisis aporta información de utilidad sobre las potenciales relaciones filogenéticas de los aislados. Sin embargo, la tendencia actual es la del análisis de secuencias de múltiples *loci* (*multilocus sequence analysis*, MLSA) incluyendo la secuenciación parcial de genes que codifiquen para proteínas con funciones conservadas y de copia única en el genoma (*genes housekeeping*), ya que permite una mayor resolución a la hora de determinar las relaciones filogenéticas dentro de un género (Glaeser & Kämpfer, 2015). Este planteamiento quedó fuera de los objetivos de esta tesis y se contempla como una parte de la línea futura en el trabajo con los aislados aquí obtenidos.

Para la obtención de los árboles filogenéticos, se descargaron las secuencias de las cepas tipo descritas hasta la actualidad de cada género bacteriano de la base de datos de EZtaxon (Yoon et al., 2017), la cual incluye secuencias de calidad del gen *16S rRNA* de prácticamente todas las cepas tipo bacterianas descritas. La inclusión de estas secuencias en el árbol permite visualizar las relaciones filogenéticas de nuestros aislados con especies descritas del mismo género. Además, para cada género, se obtuvo la secuencia del gen *16S rRNA* de un género perteneciente a otra familia dentro del mismo phylum, que sirve como grupo externo del árbol filogenético para representar de manera adecuada la polaridad de la filogenia. Una vez obtenidas estas secuencias, junto con las secuencias consenso de cada grupo (secuencia con los nucleótidos más frecuentes en cada posición del alineamiento) se llevó a cabo un alineamiento con la herramienta MAFFTv7.490 (Katoh & Standley, 2013) implementada dentro del software Geneious, con el algoritmo G-INS-i (indicado para un número bajo de secuencias y con homología global) y una matriz de puntuación 1 PAM/ k=2, adecuada para secuencias con alta similitud. Las secuencias fueron recortadas a la misma longitud de alineamiento y se repitió este proceso. Con el alineamiento final, se produjo el árbol filogenético siguiendo el método de maximum likelihood implementado en Geneious con la

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

herramienta phyML v.3.3.20180621 (Guindon et al., 2010). El modelo de sustitución elegido fue el de GTR (*Generalized Time-Reversible model*), estableciendo el parámetro gamma de distribución en 20. En primer lugar, se llevó a cabo el árbol con un número de réplicas de 100 (*bootstrap*) para visualizar de manera preliminar el resultado y evaluar las cepas tipo que se incluirían en el árbol final, eliminando aquellas que aporten información redundante. Para aquellos géneros que presentaron en su secuencia un 100 % de identidad con una única cepa tipo, no se realizó el árbol filogenético final. Para los demás casos, con las cepas tipo finalmente seleccionadas se realizó el árbol filogenético siguiendo los parámetros anteriormente descritos y aumentando el número de réplicas a 1.000 (*bootstrap*).

### **M.5.2. Procesamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva con SEED2.**

El software SEED2 (Větrovský et al., 2018) fue usado para el análisis de las secuencias obtenidas de las muestras de Mancha Real (Apartado M.1.1). El servicio de secuenciación nos proporcionó las secuencias separadas por muestra (gracias al demultiplexado) y sin secuencias del fago Phi-X174. Se obtuvieron un total de 50 archivos después de la secuenciación, dos archivos para cada muestra debido a las dos lecturas (directa "forward" y reversa "reverse", también conocidas como R1 y R2). Estos archivos fueron sometidos a un primer análisis de calidad utilizando la herramienta *FastQC* (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para usar esta herramienta, se necesita tener todas las secuencias de cada lectura para todas las muestras en un solo archivo, lo que se logró fácilmente con la función "cat" de Ubuntu (Linux). Basándonos en los datos de calidad proporcionados por *FastQC*, se realizaron recortes de las secuencias en regiones donde la calidad era demasiado baja (por debajo de Q20), lo que ocurre principalmente en los extremos 3'. El recorte se llevó a cabo utilizando la herramienta FASTX-toolkit v.0.014 y la función "fastxtrimmer" ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) hasta que las secuencias tuvieran una calidad media superior a Q25.

Tras este recorte de las secuencias, se realizó el solapamiento de las secuencias *forward* y *reverse* utilizando el programa fastq-join v1.3.1 (disponible en Github <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils/blob/wiki/FastqJoin.md>). Se estableció un solapamiento mínimo de 40 pb para hongos y 100 pb para bacterias, con un máximo de 15 % de diferencias en la región solapante. La longitud del solapamiento elegida es diferente para la región ITS2 y el gen *16S rRNA* debido a las características de estas secuencias. La región ITS2 es una región intergénica con una longitud variable. Por ende, la longitud de solapamiento también es más variable que en el gen *16S rRNA* y el establecimiento de un solapamiento más restrictivo puede llevar a la pérdida de una gran cantidad de información. En el caso del gen *16S rRNA*, se sabe que solapará en más de 100 pb debido a las características de esta región y a las longitudes de secuenciación elegidas en nuestro estudio. Si el solapamiento fuera menor, es muy probable que fuera debido a errores de secuenciación.

El software SEED2 v.2.1.05 se utilizó para procesar las secuencias ya solapadas. En el caso de los datos de bacterias, se eliminaron las secuencias con un índice de calidad promedio menor a Q30, seguido de la eliminación de las secuencias de los primers. La región secuenciada tiene una longitud bastante conservada por lo que se pudo llevar a cabo este proceso mediante el corte de las secuencias en 17 nucleótidos para el primer *forward* y en 21 para el *reverse*. Además, esto permitió ahorrar tiempo de computación ya que, al ser los primers degenerados, sería muy costoso buscar todas las opciones posibles.

Continuando con la limpieza de las secuencias, se eliminaron aquellas con nucleótidos ambiguos y aquellas secuencias con una longitud menor a 400 pb. La eliminación de quimeras se realizó simultáneamente a la agrupación de OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) con la herramienta USEARCH "De Novo" v.2.4.3 (Edgar & Bateman, 2010) implementada en SEED2. Los OTUs se realizaron agrupando secuencias con un mínimo del 97 % de similitud entre ellas. Una vez obtenidos los OTUs, se aplicó un filtrado para eliminar aquellos OTUs que correspondían a errores de asignación en el demultiplexado. Esto se hizo siguiendo las recomendaciones de Bokulich y colaboradores (2013), en cuyo trabajo analizaron el impacto de diferentes tipos de filtrado en los resultados de secuenciación de cuatro comunidades sintéticas de

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

composición microbiana conocida (MOCK communities). De acuerdo con los resultados obtenidos, recomiendan incluir una *mock community* en cada *run* de secuenciación, es decir, una muestra con una composición conocida de microorganismos, que permita analizar los errores de asignación específicos de cada ensayo. En caso de no disponer de estas muestras, se recomienda eliminar aquellos OTUs que representen menos de un 0,005 % del número total de secuencias (Bokulich et al., 2013). Esta última aproximación es la que fue llevada a cabo sobre los datos aquí discutidos.

La secuencia más abundante de cada OTU se tomó como la representante de dicho OTU para la clasificación taxonómica con el software MOTHUR v.1.40.0 (Schloss et al., 2009). El método de clasificación bayesiano desarrollado por Q. Wang y colaboradores (2007) se utilizó con un umbral mínimo del 80 %. Las secuencias desconocidas, así como las de cloroplastos y mitocondrias se eliminaron de la tabla final. Las secuencias no clasificadas a nivel de dominio se eliminaron, mientras que las no clasificadas a otros niveles taxonómicos se conservaron.

Para el caso de hongos, se llevó a cabo el procesamiento de las secuencias de la región ITS2 de manera similar al del gen *16S rRNA*, con un cribado de calidad ( $Q > 30$ ) usando el mismo software. Sin embargo, en el caso de ITS2, la eliminación de primers no se pudo realizar mediante corte en una posición concreta, ya que al tratarse de una región intergénica tiene gran variabilidad en su longitud y se podría estar eliminando información de interés. Así, se le proporcionó al software la secuencia de los primers (que no son degenerados) y estos fueron eliminados de acuerdo a su secuencia. Además, también se eliminaron aquellas secuencias cuya lectura del primer fue errónea, ya que esto llevaría muy probablemente a más errores de secuenciación durante la lectura.

Una vez obtenidas las secuencias ensambladas y sin primers, se eliminaron aquellas lecturas con nucleótidos ambiguos o con una longitud menor a 100 pb. La eliminación de quimeras y la agrupación por OTUs se llevaron a cabo en dos pasos separados. Las quimeras se eliminaron primero con VSEARCH "De novo" (en SEED2) y luego se agruparon por OTUs a un 97 % de similitud, como mínimo, con VSEARCH (Rognes et al., 2016) en MOTHUR. La secuencia representante de cada OTU se clasificó utilizando la base de datos UNITE v.7.2 y se eliminaron todos los OTUs no pertenecientes

a hongos. Finalmente, se filtraron los OTUs que representaban menos del 0,005 % de las secuencias, por las mismas razones expuestas en el análisis de la librería de procariotas.

### **M.5.3. Procesamiento de secuencias obtenidas por secuenciación masiva con DADA2.**

Para el análisis de las secuencias obtenidas en los muestreos de Lupión, se implementó otro método para la obtención del perfil microbiano. En este caso, se usó la herramienta DADA2 (Callahan et al., 2016), implementada en el software R (R Core Team, 2021). Los métodos tradicionales basados en el agrupamiento de secuencias para la formación de OTUs, desaprovechan el potencial de tecnologías como la de Illumina Miseq, ya que no son capaces de distinguir diferencias menores al 3 % entre secuencias. Sin embargo, contemplar este pequeño rango de diferencias puede ser muy importante en el estudio de comunidades microbianas, ya que pueden suponer que una cepa se considere o no patogénica (Callahan et al., 2016). DADA2 consigue este nivel de precisión gracias al uso de un modelo de error basado en la información sobre la calidad de las lecturas obtenidas, que se obtiene con un algoritmo de aprendizaje automático (*Machine Learning*) al que se accede con el comando *learnErrors*. Esta función alterna la estimación de las tasas de error con la inferencia de la composición de las muestras según las tasas calculadas. Al ser un modelo de aprendizaje automático, debe comenzar con una asunción inicial, en este caso, que solo una secuencia es correcta y todas las demás son errores de secuenciación. Una vez se genera el modelo de error específico del conjunto de datos analizados, DADA2 implementa su algoritmo principal, conocido como *divisive partitioning algorithm*. En primer lugar, se asume que todas las secuencias provienen de la secuencia más abundante de la muestra analizada. Con esta asunción, se calculan los valores de  $p$  asociados a cada secuencia, teniendo en cuenta tanto el modelo de error como la abundancia de las mismas. El valor de  $p$  se calcula para comprobar la hipótesis nula de si la secuencia analizada procede de la secuencia central o no. En caso de que el valor de  $p$  caiga debajo del valor de significancia establecido, se rechaza la hipótesis nula, por lo que la secuencia analizada debería pertenecer a una nueva partición. Aquella secuencia que tenga el valor de  $p$  menor, es usada como nueva secuencia central para formar una nueva partición. Este proceso continua hasta que se

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

consigue obtener valores de  $p$  significativos para todas las secuencias y particiones. Con esto se genera lo que se conoce como ASV (*Amplicon sequence variant*), por lo que al hacer referencia a este tipo de análisis, se usará el término ASV en sustitución de OTU. Además de esto, el paquete de DADA2 en R, incluye también funciones para el filtrado previo de las secuencias en función a su calidad, eliminación de primers, eliminación de quimeras y solapamiento de las secuencias.

En concreto, para el análisis aquí descrito se siguió el tutorial asociado al paquete de R Micro4all ([https://nuriawm.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriawm.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)) (Wentzien et al., 2023), cuyo desarrollo e implementación se describe más adelante en el Apartado M.6. En primer lugar, se hizo un análisis preliminar para conocer la calidad de la secuenciación. Para ello, se calculó el mínimo número de secuencias en una muestra. Además, se utilizó la función *plotQualityProfile* del paquete DADA2 para observar la variación del índice de calidad de las bases a lo largo de las secuencias. Este valor suele bajar en las últimas bases, lo cual es un comportamiento inherente a la secuenciación Illumina. Durante este tipo de secuenciación, se realizan ciclos donde se añaden nucleótidos modificados que contienen un bloqueador de la polimerización. Esto permite detectar la señal de manera sincronizada entre todas las secuencias. Tras detectar la señal, se lava la celda y el bloqueador se libera enzimáticamente, de manera que se pueda continuar con un nuevo ciclo. Conforme avanza este proceso, puede ocurrir que algún bloqueador no haya sido eliminado, por lo que se generará un desfase de lectura. Este tipo de errores se irán acumulando conforme continua la secuenciación, lo que dificulta la toma de señales y la detección de los clústeres. Por estas razones, esta caída de la calidad se pronuncia más aún en las lecturas reversas, ya que son secuenciadas después de las forward.

La información de *plotQualityProfile* se usó para conocer si la secuenciación era adecuada o no, viendo si la caída de calidad ocurría únicamente en los últimos nucleótidos, donde este comportamiento es esperable. Estos gráficos también se pueden usar para conocer la longitud a la que las secuencias pueden ser cortadas para eliminar esos potenciales errores. Sin embargo, en este caso se optó por usar la herramienta FIGARO (Sasada et al., 2020), que permite hacer una selección automatizada de los parámetros de filtrado para DADA2, como la longitud de corte de

la secuencia (argumento *truncLen* de la función *filterAndTrim*) y el máximo de errores esperados (argumento *maxExpectedError* de la función *filterAndTrim*). Gracias a FIGARO, la elección de estos parámetros no queda en manos del usuario, si no que se calcula teniendo en cuenta la calidad de las secuencias y el porcentaje de secuencias retenidas. Para utilizar esta implementación, fue necesario hacer un corte de las secuencias a 295 pb, ya que la versión usada de FIGARO no soportaba las diferencias en la longitud de las secuencias. El resultado indicado por FIGARO se aplicó a la función *filterAndTrim* sobre las secuencias originales (en su longitud completa).

Tras esto, se llevó a cabo la eliminación de los primers. DADA2 implementa un argumento en la función *filterAndTrim* llamado *trimLeft* que permite la eliminación de los primers basándose en la longitud de los mismos. Sin embargo, esto puede ser impreciso ya que puede haber secuencias donde no se encuentren los primers en esas posiciones. También puede ocurrir que se encuentren los dos primers, si la secuencia tiene un tamaño pequeño y se produce la lectura hasta el final de la misma (sobre todo para el caso de hongos). Por ello, la herramienta CUTADAPT (Martin, 2011) ofrece una implementación más precisa, permitiendo la búsqueda de los primers basándose en su secuencia. Además, implementa una gran variedad de argumentos, permitiendo, por ejemplo, descartar aquellas secuencias donde no se haya encontrado el primer.

Una vez se obtienen las secuencias filtradas y sin primers, se procede a seguir el protocolo estandarizado de DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). El primer paso consistió en calcular el modelo del error del conjunto de datos, usando la función *learnErrors*. Tras esto, se infirieron los ASVs en cada muestra utilizando la función *dada*, que implementa el algoritmo de partición y que se realiza tanto para las secuencias forward como las reverse. Por ello, tras este paso es necesario solapar las secuencias utilizando la función *mergePairs*. Se procedió a obtener una tabla de secuencias gracias a la función *makeSequenceTable* y a eliminar las quimeras con la función *removeBimeraDenovo*.

Con la tabla de ASVs obtenida, se procedió a inspeccionar la longitud de las secuencias y la abundancia de esos ASVs. Esto es necesario puesto que pueden obtenerse lecturas de alta calidad pero que sean producto de amplificaciones inespecíficas. Estas pueden ser detectadas en muchos casos por presentar una longitud

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

de la secuencia menor o mayor al esperado. En nuestro caso concreto, se conservaron aquellos ASVs con una longitud de secuencia entre 402 y 428 pb.

Una vez obtenida esta tabla, se procedió a hacer una revisión final del número de secuencias retenido por muestra en cada paso del proceso. En principio, no se debería observar una caída del número de secuencias muy drástico entre ninguno de los pasos, a excepción del paso de filtrado. Si esto ocurre, podría ser indicativo de algún tipo de problema en las secuencias. Por ejemplo, podría ocurrir que el solapamiento no estuviera ocurriendo en la mayoría de las secuencias por un problema a la hora de eliminar los primers.

Finalmente, las secuencias obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente utilizando la base de datos RDP *trainset* v18 (Cole et al., 2014) y la función de DADA2 llamada *assignTaxonomy*, la cual utiliza una implementación del método bayesiano desarrollado por Q. Wang y colaboradores (2007), aunque el umbral utilizado fue del 50 % que es el que tiene esta función por defecto.

Para el caso de hongos, el procedimiento descrito arriba se siguió de manera muy similar, pero con ciertas excepciones, debido a las características de la región secuenciada. Al tratarse de una región intergénica, su longitud es muy variable, por lo que no se aplicó un corte según la longitud (con el argumento *trunLen*) ni tampoco se usó la herramienta FIGARO. Por esta misma razón, una vez obtenida la tabla inicial con los ASVs tras el solapamiento, no se eliminaron los ASVs según su longitud. Por último, la clasificación taxonómica se llevó a cabo utilizando la función *assignTaxonomy* pero con la base de datos UNITE v7.2 (Nilsson et al., 2019).

### **M.5.4. Filtrado de secuencias según una MOCK community y eliminación de secuencias de planta.**

En las secuenciaciones correspondientes a las fincas OM y CM, así como para las muestras de semillas, en el proceso de secuenciación se incluyó una *mock community* o comunidad sintética, es decir, unas muestras con una composición bacteriana y fúngica de proporciones conocidas. Específicamente, se utilizó la comunidad sintética de ZymoBIOMICS *Microbial Community Standard II* (Log Distribution), ZYMO RESEARCH

(<https://www.zymoresearch.com/collections/zymbiomics-microbial-community-standards/products/zymbiomics-microbial-community-standard-ii-log-distribution>).

Se secuenciaron tres réplicas de esta comunidad por run. La composición de la comunidad sintética se muestra en la Tabla M4.

**Tabla M4. Se muestra la composición de la comunidad sintética utilizada en los ensayos de secuenciación masiva mediante Illumina MiSeq.** La información ha sido extraída de la ficha del producto: ZymoBIOMICS Microbial Community Standard II (Log Distribution), ZYMO RESEARCH.

Especie	Composición (%)				
	ADN genómico	16S	16S y 18S	Copias del genoma	Número de células
<i>Listeria monocytogenes</i>	89,1	95,9	91,9	94,8	94,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,9	2,8	2,7	4,2	4,2
<i>Bacillus subtilis</i>	0,89	1,2	1,1	0,7	0,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,89	NA	4,1	0,23	0,12
<i>Escherichia coli</i>	0,089	0,069	0,066	0,058	0,058
<i>Salmonella entérica</i>	0,089	0,07	0,067	0,059	0,059

## MATERIAL Y MÉTODOS

<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,0089	0,012	0,012	0,015	0,015
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,00089	0,00067	0,00064	0,001	0,001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,00089	NA	0,0014	0,00015	0,00007
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,000089	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Una vez obtenida la tabla con la clasificación, se analizaron los ASVs correspondientes a los miembros de la *mock community*. La idea de este análisis es encontrar algún ASV en las muestras de la *mock* que no pertenezca originalmente a esta. Esto puede ocurrir por asignación errónea de una secuencia a una muestra por problemas de PCR o secuenciación en los códigos de barras de Illumina (MIDs). Así, se calcula el porcentaje de secuencias que supone ese ASV extraño de la *mock community* respecto al total de secuencias de la misma. Este porcentaje se usó como un criterio de filtrado, eliminando aquellos ASVs que supongan menos de ese porcentaje de secuencias en todo el run de secuenciación. Esto se puede hacer de manera manual o automatizada, utilizando la función *MockCommunity* del paquete *Micro4all*, cuyo funcionamiento se detalla en el Apartado M.6.

En el caso de la secuenciación de las fincas con diferentes manejos agrícolas, el filtrado mediante análisis de la *mock community* se realizó en un porcentaje de secuencias del 0,002 %. Este filtrado se calculó en base a los miembros bacterianos de

la comunidad, puesto que la representación fúngica de la comunidad sintética es muy escasa. Por ello, este mismo filtrado se aplicó a la tabla de ASVs fúngicas, ya que ambas comunidades fueron secuenciadas en el mismo run.

Tras este filtrado, se eliminaron las secuencias pertenecientes a cloroplastos, mitocondrias y las no clasificadas a nivel de dominio. En concreto, se eliminaron:

- Géneros y familias Streptophyta, Chlorophyta, Bacillariophyta,
- Familia Mitochondria.
- Clase y orden *Chloroplast*
- Dominio Eukaryota
- Dominio no clasificado (unclassified).
- Phylum *Cyanobacteria/Chloroplast* que no fuera clasificado a niveles taxonómicos inferiores.

En el caso de hongos, se eliminó todo lo que no perteneciera al dominio *Fungi*.

En el análisis de las secuencias procedentes de semilla, el filtrado mediante la *mock community* no se llevó a cabo ya que suponía la pérdida de una gran cantidad de secuencias. Al tratarse de muestras con una abundancia bacteriana y fúngica menor, se decidió aplicar el corte recomendado por Bokulich y colaboradores (2013) (eliminar secuencias que suponen menos del 0,005 % del número total de secuencias), tal y como se describió en el Apartado M.5.2, en concreto, aplicándolo tras la eliminación de las secuencias procedentes de plantas.

### **M.5.5. Análisis ecológico de la comunidad microbiana**

En general, los análisis a nivel ecológico de las comunidades microbianas se realizaron siguiendo el tutorial del paquete Micro4all ([https://nuriaww.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriaww.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)) utilizando el software R (R Core Team, 2021). Alguno de los análisis fueron realizados empleando otro tipo de herramientas, como ocurrió para el caso de las redes de coocurrencia o ciertos análisis de abundancia diferencial, que serán explicados en detalle en esta sección.

### M.5.5.1. Diversidad $\alpha$

La diversidad  $\alpha$  se refiere a la diversidad que ocurre dentro de una zona determinada o ecosistema y se suele calcular como número de especies (riqueza) o distribución de las mismas (diversidad) (Andermann et al., 2022). Para poder comparar esta diversidad (calculada con una serie de índices) entre muestras o grupos, es necesario que tengan un número de secuencias similar. Si una muestra presenta un número de secuencias mucho mayor a otra, puede ser que, por ejemplo, su riqueza de especies sea mayor por el simple hecho de tener una mayor representación de la población. Para solventar este problema, se llevó a cabo un tipo de normalización conocida como rarefacción. Este método consiste en reducir todas las muestras al mismo número de secuencias, basándose en la muestra con la menor profundidad de secuenciación (Weiss et al., 2017). Para reducir los sesgos generados durante este procedimiento, se realiza un submuestreo aleatorio de las secuencias, obteniéndose así una representación de las muestras originales, pero estando todas a igual profundidad de muestreo. Una pregunta que surge ante esta normalización es la posible pérdida de información de las muestras. Para atender a esta problemática, se realizan unos gráficos conocidos como curvas de rarefacción. Estos representan, para cada muestra, el número de ASVs (eje Y) frente al número de secuencias (eje X). Estas curvas tienden a la asíntota cuando el número de secuencias es alto, es decir, dado un determinado número de secuencias, una mayor profundidad de secuenciación no devolvería mucha más información en cuanto a especies (o ASVs) diferentes. De esta manera, si la rarefacción ocurre en la asíntota de estas curvas, se estima que la pérdida de información es despreciable. La rarefacción fue llevada a cabo con la función *rarefy\_even\_depth* del paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). Para obtener las curvas de rarefacción, se usó la función *rarecurve* del paquete vegan (Wagner H, 2018).

La diversidad alfa fue evaluada a nivel de ASV/OTU mediante el cálculo de una serie de índices, utilizando la función *estimate\_richness* del paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). Los índices calculados fueron:

- **Riqueza observada.** La riqueza observada se obtiene de la cuantificación del número de especies diferentes (en este caso, ASVs/OTUs) observadas en cada muestra.
- **Índice de Shannon** (C. E. Shannon, 1948). Permite estimar la diversidad de la comunidad y se calcula teniendo en cuenta la proporción de individuos encontrados de una especie respecto al número total de individuos. Esto se multiplica por su logaritmo natural y se hace el sumatorio para todas las especies encontradas. Su fórmula es:

$$H = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i),$$
 donde  $S$  corresponde con el número total de especies y  $p_i$  con la proporción del individuo  $i$  respecto al número total de individuos.

- **Índice de Simpson** (Simpson, 1949). Permite estimar la diversidad de la comunidad de una manera diferente a la propuesta con el índice de Shannon. En concreto, se basa en la probabilidad de encontrar al azar dos individuos de la misma especie en una muestra (dominancia). Su fórmula es:

$$D = - \sum_{i=1}^S p_i^2,$$
 donde  $p_i$  corresponde con la proporción de la comunidad representada por el ASV/OTU  $i$  y  $S$  el número total de especies (ASVs/OTUs) de la comunidad. Como es común en muchos análisis de diversidad, se utilizó la inversa de este índice ( $1/D$ ), de manera que su interpretación corresponda con una mayor diversidad en cuanto su valor aumente (menor probabilidad de encontrar dos individuos de la misma especie).

- **Índice de Pielou** (Pielou, 1966). Este índice, también conocido como índice de equidad de Shannon, permite estudiar la equidad de la comunidad, es decir, cómo de equitativamente están distribuidas las especies. Se calcula como la proporción de la diversidad observada, obtenida mediante Shannon, respecto a la diversidad máxima de la muestra. Este índice fue calculado manualmente en R, puesto que no existe una función para dicho propósito. La fórmula es:  $J = \frac{H}{\ln S}$ .

Además, se llevaron a cabo comparaciones estadísticas para cada índice entre los grupos analizados. Para la elección del test estadístico a utilizar, se comprobó en primer lugar si los datos presentaban una distribución normal y una homogeneidad

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

entre sus varianzas. Esto se llevó a cabo con un test de Shapiro-Wilks y un test de Levene, respectivamente, con las funciones *Shapiro* y *levene.test.alpha* del paquete *Micro4all*. En el caso de que los datos se distribuyeran de manera normal y hubiera homogeneidad entre sus varianzas, se utilizó un test de ANOVA (*Analysis of Variance*) con la función *BalancedAnova* del paquete *Micro4all*. En el caso de no presentar estas características, se usó un test no paramétrico conocido como Kruskal-Wallis, implementado en la función *Kruskall.wallis* del paquete *Micro4all*. En el caso de múltiples grupos, tras el test de varianzas para la comparación de las medias se realizó un test *post-hoc* para obtener las comparaciones dos a dos. En concreto, los métodos utilizados fueron el test de Tukey HSD o test de Mann-Whitney-Wilcoxon, ambos implementados en *Micro4all* con las funciones *Tukey.test* y *wilcoxon.test*, para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Para reducir los falsos positivos derivados de la realización de comparaciones múltiples, los valores de  $p$  fueron corregidos según el método de Benjamini-Hochberg FDR.

Una vez se calcularon estos índices y realizados los test estadísticos pertinentes, se llevó a cabo la representación gráfica de los resultados mediante el uso del paquete *ggplot2* (Wickham, 2009). Todas las representaciones gráficas se encuentran explicadas en detalle en el tutorial asociado al paquete *Micro4all* ([https://nuriawm.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriawm.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)), de manera que su implementación por el usuario sea lo más sencilla posible.

### M.5.5.2. Diversidad $\beta$

La diversidad  $\beta$  permite estudiar la diferencia en la estructuración de las comunidades de diferentes grupos de muestras. De esta manera, proporciona información muy útil sobre la relación entre las especies de la comunidad y las condiciones a las que se ven expuestas (Andermann et al., 2022).

Para analizar este tipo de diversidad (también realizada a nivel de ASV/OTU), se emplean una serie de métodos que permiten cuantificar la diferencia entre las comunidades. Estos métodos o métricas pueden clasificarse en métricas cuantitativas (como las disimilitudes de Bray-Curtis o las distancias Weighted Unifrac) y métricas

cualitativas (como unweighted UniFrac) (Knight et al., 2018). Las métricas cuantitativas incorporan la información de la abundancia de las especies, mientras que las métricas cualitativas solo tienen en cuenta la presencia o ausencia de especies. Específicamente, las disimilitudes Bray-Curtis se calculan en función a las abundancias relativas de las diferentes especies entre grupos (Bray & Curtis, 1957). La distancia Weighted Unifrac, por su parte, no sólo tiene en cuenta estas abundancias relativas, sino también la distancia filogenética entre especies, basándose en un árbol filogenético (C. A. Lozupone et al., 2007). Por último, la distancia Unifrac se basa tan solo en las distancias filogenéticas sin incorporar información de la abundancia relativa de las especies (C. Lozupone et al., 2011).

Debido a la naturaleza de estas métricas, es conveniente realizar una normalización de las muestras según su tamaño de librería, tal y como ocurría con la diversidad  $\alpha$ . En este caso, se realizó una normalización por el método de *Trimmed Mean of Means* implementado en el paquete *edgeR* (Robinson MD, McCarthy DJ, 2010). Con este método, se calcula el tamaño de librería efectivo teniendo en cuenta la composición de la comunidad y las abundancias son transformadas según estos factores.

Una vez las muestras fueron normalizadas, se calcularon las métricas correspondientes y se realizó la comparación estadística entre grupos mediante un PERMANOVA (*Permutational analysis of variance*), que permite evaluar la significancia de la diferencia en la distribución de dos grupos de objetos, en este caso, métricas de diversidad  $\beta$  (Anderson, 2001). Esta prueba se utilizó según su implementación en Micro4all con la función *Permanova*, que permite computar esta prueba de manera simultánea para diferentes métricas. Un resultado positivo de esta prueba puede no sólo deberse a una diferencia significativa entre los centroides de los grupos comparados, sino también a una diferencia en la dispersión de los datos. De esta manera, PERMANOVA no es suficiente para distinguir si los grupos analizados presentan una separación estadísticamente significativa en cuanto a la métrica de diversidad utilizada. Para ello, es necesario realizar un gráfico de ordenación, donde se representa gráficamente la disimilitud o distancia entre las muestras, así como un test de dispersión beta, que evalúa la homogeneidad de las varianzas entre grupos de muestras (Anderson et al., 2006). Esta prueba se llevó a cabo mediante su implementación en la función

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

*Betadispersion* del paquete *Micro4all*. A continuación, se indican los escenarios posibles ante un resultado estadísticamente significativo en un PERMANOVA:

- Existe una diferencia significativa entre los centroides de los grupos. La dispersión de los datos es similar entre grupos. En este caso, el gráfico de ordenación muestra una separación clara entre grupos. Además, el test BETADISPER no devolvería diferencias estadísticamente significativas.
- No existe diferencia estadísticamente significativa entre los centroides de los grupos, pero sí entre las dispersiones. El gráfico de ordenación muestra un solapamiento de los puntos pertenecientes a diferentes grupos y el test de dispersión devuelve diferencias estadísticamente significativas.
- Existen diferencias estadísticamente significativas tanto entre los centroides de los grupos como entre las dispersiones. El gráfico de ordenación muestra una separación entre grupos, mientras que el test de dispersión devuelve diferencias estadísticamente significativas.

El test PERMANOVA, además, proporciona información sobre el porcentaje de varianza explicada, gracias al valor del  $R^2$ . Además, para poder realizar comparaciones dos a dos entre los grupos analizados mediante PERMANOVA, se realizó un test *post hoc* gracias a la función *pairwiseadonis2* del paquete *pairwiseAdonis* (Martinez-Arbizu, 2019).

Los gráficos de ordenación se llevaron a cabo utilizando dos metodologías diferentes: PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) y NMDS (*Non-metric multidimensional scaling*). Estos corresponden con métodos exploratorios. Los métodos exploratorios se usan para analizar las relaciones entre objetos basándose en las variables que se miden en ellos. En este caso, estas variables corresponden con métricas de diversidad  $\beta$ . Con estos métodos, se puede realizar una visualización de las similitudes entre objetos, ya que los objetos parecidos se sitúan cercanos en el espacio gráfico y los diferentes se encuentran más alejados. Para el caso del PCoA, se crean variables artificiales que se conocen como coordenadas principales. Estas variables corresponden con los ejes del gráfico y representan la variabilidad entre datos explicadas por estas variables. El PCoA permite realizar este tipo de representación sin depender en distancias euclídeas, que no son adecuadas para datos de ecología microbiana, sino que puede utilizar

distancias/disimilitudes como UniFrac, Bray-Curtis y Weighted-UniFrac, entre otras (Paliy & Shankar, 2016). Normalmente se utilizan sus dos primeros ejes para la representación, pues son los que explican mayor porcentaje de variabilidad. Por su parte, en el método NMDS, el número de ejes es fijado y el método ajusta la variabilidad de los datos a las dimensiones establecidas. Así, se calcula un valor de estrés que se relaciona con la probabilidad de que esa representación se produzca por azar (Paliy & Shankar, 2016).

La ordenación y los gráficos correspondientes se obtuvieron con las funciones *ordinate* y *plot\_ordination* del paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). También se usó el paquete ggplot2 para mejorar la representación gráfica de los mismos (Wickham, 2009).

Para la interpretación de la diversidad  $\beta$ , se eligió la métrica de distancia/disimilitud y el método de ordenación que devolvieran un mayor porcentaje de varianza explicada para los datos.

### **M.5.5.3. Perfiles taxonómicos**

Los perfiles taxonómicos de los diferentes muestreos se realizaron tanto a nivel de phylum como a nivel de género. Esto se llevó a cabo en base a las abundancias relativas de los diferentes taxones. Estos gráficos fueron generados utilizando el software R y siguiendo las indicaciones del tutorial online Micro4all ([https://nuriaww.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html#taxonomic-profile-graphics](https://nuriaww.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html#taxonomic-profile-graphics)). El procedimiento consistió en el cálculo de la media de las abundancias relativas entre las diferentes muestras de cada finca o genotipo, para proceder con su representación gráfica utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2009).

### **M.5.5.4. Análisis de abundancia diferencial de taxones**

El software STAMP v.2.1.3 fue utilizado para examinar los géneros que presentaron diferencias estadísticamente significativas y biológicamente relevantes entre las comunidades, las cuales también mostraron una diferencia notable en sus

## MATERIAL Y MÉTODOS

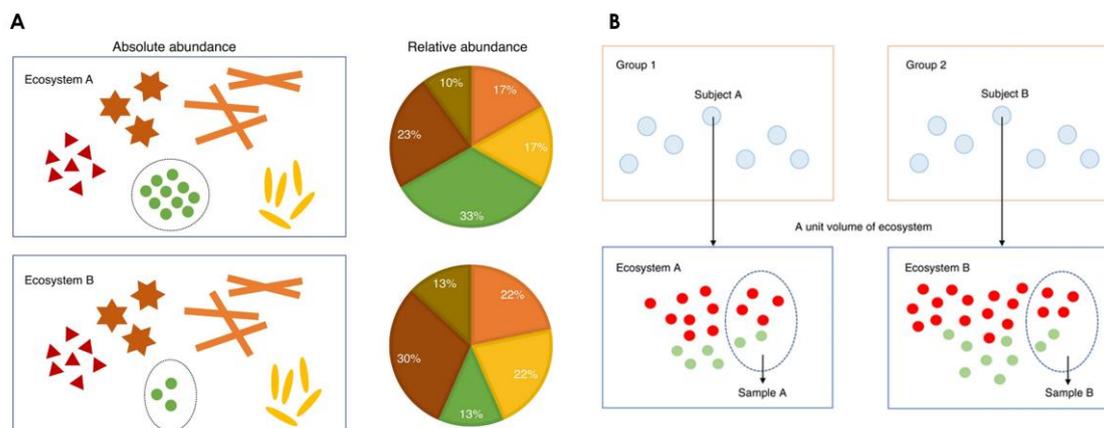
---

diversidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Se llevaron a cabo comparaciones tanto de múltiples grupos como dos a dos. Para las comparaciones de múltiples grupos, se utilizaron los parámetros por defecto, mientras que para las comparaciones dos a dos, se aplicó un t-test de Welch con corrección del valor de  $p$  mediante Benjamini-Hochberg FDR. Se establecieron ciertos criterios para filtrar los resultados estadísticamente significativos de acuerdo con su relevancia biológica, en concreto, se consideraron relevantes aquellos géneros que presentaron una diferencia entre proporciones de 0,5 % o más y una ratio de proporciones de 2 o más.

Para datos analizados posteriormente, como fue el caso de los datos de las fincas CM y OM, así como para los datos de semilla, se utilizó una aproximación diferente para calcular las abundancias diferenciales de taxones. Específicamente, se usó ANCOM-BC (Lin & Peddada, 2020), un método que ha sido diseñado especialmente para el caso de datos de microbioma. Estos datos presentan una serie de inconvenientes a la hora de su análisis estadístico. Por un lado, se trata de datos composicionales. Es decir, las abundancias de los microorganismos suman 1, por lo que sus valores no son independientes unos de otros. En la Figura M1 panel A, se puede observar una representación gráfica de esta problemática. Imaginemos dos ecosistemas donde aparecen los mismos individuos (OTUs/ASVs) en la misma abundancia, a excepción de uno de ellos, que es más abundante en el ecosistema A. Debido a que las abundancias se expresan como abundancias relativas, inevitablemente, en el ecosistema A las abundancias de los demás taxones serán menores a las del ecosistema B, a pesar de que sus abundancias absolutas originales no diferían. Este tipo de composicionalidad de los datos requiere un análisis estadístico específico, puesto que los métodos clásicos (por ejemplo, ANOVA), no atienden a esta problemática y acarrear un aumento de los errores tipo I (falsos positivos). Además, la información captada por una muestra de la población del ecosistema no sólo va a depender del tamaño de las librerías. Como se puede observar en la Figura M1 panel B, es posible que la abundancia absoluta de dos individuos sea diferente entre dos ecosistemas, a pesar de que la proporción calculada a partir de muestras con el mismo tamaño de librería sea la misma. Así, ANCOM-BC atiende de manera específica a estos problemas, utilizando el método de Aitchison (Aitchison, 1982) para la composicionalidad de los datos e infiriendo las abundancias

absolutas de los taxones. Por otra parte, otra característica de los datos de microbiomas por secuenciación masiva es la presencia de muchos ceros, es decir, se tratan de datos dispersos (*sparse data*). Esta propiedad complica los análisis ya que es vital distinguir la naturaleza de estos ceros, pudiendo clasificarse en: (i) cero estructural (es realmente cero en el ecosistema), (ii) un cero de muestreo (por falta de profundidad de secuenciación) o (iii) un valor atípico. En este sentido, ANCOM-BC desarrolla métodos específicos para discernir la naturaleza de los ceros encontrados en los datos de microbioma. De esta manera, desde la publicación del método ANCOM-BC y su implementación en R, se consideró esta herramienta como un tipo de análisis más oportuno para estudiar las diferencias en las abundancias de taxones microbianos entre condiciones.

ANCOM-BC se encuentra implementado en R a través del paquete ANCOMBC (Lin & Peddada, 2020). Sin embargo, la función *ancombc* no permite realizar comparaciones dos a dos entre todos los grupos de muestras a analizar, si no que realiza el test entre el primer grupo y todos los demás. Así, para poder realizar todas las combinaciones posibles, se implementó una función en el paquete Micro4all llamada *ancomloop*. Con esta función se llevaron a cabo las comparaciones necesarias.



**Figura M1. Esquema sobre la composicionalidad de los datos de metataxonomía.** Figura tomada de Lin & Peddada, 2020. En esta figura se muestra la problemática asociada a datos composicionales de muestras microbiológicas sometidas a secuenciación masiva. En el panel A, se representan dos ecosistemas donde aparecen los mismos individuos (OTUs/ASVs) en la misma abundancia, a excepción de uno de ellos, que es más abundante en el ecosistema A (rodeado con un círculo). Debido a que las abundancias se expresan como abundancias relativas, inevitablemente, en el ecosistema A las abundancias de los demás taxones serán menores a las del ecosistema B, a pesar de que sus abundancias absolutas originales no difieran. En el panel B, se ejemplifica otra problemática añadida a estos datos, en la que la información captada por una muestra de la población del ecosistema no sólo va a depender del tamaño de las librerías, sino que también dependerá de la carga microbiana original. En este panel, se puede observar que, a pesar de que el tamaño de librería muestreado sea igual entre dos muestras de dos ecosistemas diferentes, la abundancia absoluta de los OTUs/ASVs son realmente diferentes entre ecosistemas.

### M.5.5.5. Análisis de coordenadas principales (CAP)

Con los datos obtenidos de la finca muestreada en Mancha Real, se llevó a cabo un Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP). Este método pertenece a la categoría de métodos interpretativos que permiten estudiar la variabilidad de la comunidad microbiana explicada por una serie de variables explicativas. En este caso, las variables explicativas fueron los parámetros fisicoquímicos del suelo. En concreto, se

buscan variables en el espacio multidimensional que maximicen la relación entre las variables explicativas y las variables respuesta (en este caso, la diversidad  $\beta$  de la comunidad). En primer lugar, se seleccionaron aquellos parámetros fisicoquímicos que no presentaran una relación de colinealidad entre ellos, es decir, que no pudieran ser predichos a partir de otros parámetros. Esto se llevó a cabo utilizando el factor de inflación de la varianza (VIF, *Variance Inflation Factor*). Este fue calculado para todos los parámetros y permite obtener información sobre la cantidad de varianza de una variable que es explicada por otras variables independientes por correlación. Se considera que un valor VIF superior a 10 indica una relación lineal entre variables (Chatterjee & Hadi S., 1979; Kutner et al., 1996). En cuanto un parámetro presentaba este valor, era eliminado y se procedía de nuevo al cálculo, hasta obtener aquellos parámetros con valores de VIF menores a 10. Este cálculo se llevó a cabo con la función *vif.cca* del paquete *vegan* (Wagner H, 2018).

Una vez seleccionados los parámetros, se realizó la ordenación utilizando distancias Weighted UniFrac para bacterias y disimilitudes Bray-Curtis para hongos. Esto se hizo empleando la función *ordinate* del paquete *vegan* (Wagner H, 2018), donde se indicó la métrica de distancia/disimilitud usada y las variables ambientales. La representación gráfica se llevó a cabo utilizando el paquete *ggplot2* y la función *plot\_ordination* de *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013). En este gráfico se representaron aquellos parámetros no lineales que, además, explicaban de manera significativa la variabilidad de la comunidad, lo que se determinó mediante un test de ANOVA con la función *anova.cca*. Por último, se estudió la correlación entre los géneros bacterianos y fúngicos con los parámetros fisicoquímicos mediante la función *cor.test* del paquete *stats* (incorporado por defecto en el software R). Esto se realizó tan solo para los géneros con una abundancia relativa mayor o igual al 0,1 %. Se tuvo en cuenta el coeficiente de correlación de Spearman para determinar las correlaciones fuertes y estadísticamente significativas, en concreto, aquellas con un valor mayor o igual a 0,6 o menor o igual a -0,6. Estos pasos fueron seguidos principalmente en base a lo publicado por Hartman y colaboradores (2018).

### M.5.5.6. Microbioma esencial y accesorio

El análisis del microbioma esencial (*core microbiome*) es una técnica ampliamente distribuida en los estudios de ecología microbiana y que busca encontrar taxones que puedan ser de relevancia en las comunidades microbianas estudiadas. Este microbioma esencial se define como aquel conjunto de microorganismos característicos de un hospedador o entorno y se cuantifica según su persistencia en un huésped o nicho a través de distintas condiciones espaciales o temporales (Hernandez-Agreda et al., 2017; Neu et al., 2021). Por tanto, definiremos el microbioma accesorio como aquel que ocurre de manera específica en ciertos nichos, huéspedes o tiempos y que puedan relacionarse con características particulares de los mismos.

El microbioma esencial fue calculado para las muestras tomadas de la finca de Mancha Real de manera separada para bacterias y hongos. En este caso, se determinó para todas las combinaciones posibles de condiciones. Además, este análisis también se determinó para el caso del análisis de semillas. En este caso, se calculó el microbioma esencial entre los diferentes genotipos de olivo estudiados.

Para los datos de las muestras tomadas en Mancha Real, este análisis se llevó a cabo de manera manual utilizando la herramienta de Microsoft Excel (MS Excel 2016). Sin embargo, para el análisis de los datos obtenidos de semillas de olivo, se recurrió a utilizar el paquete de R *microbiome* (Lathi & Shetty, 2017) mediante el uso de la función *core*, ya que facilita y automatiza el procedimiento. En el caso de las muestras de Mancha Real, se estableció el microbioma esencial como aquellos géneros presentes en todas las réplicas de las dos condiciones comparadas en cada caso. Además, el microbioma accesorio se estableció como aquellos géneros que estaban presentes en todas las muestras de una única condición. Por otro lado, se realizaron diagramas de Venn utilizando Excel (MS Excel 2016).

Para el caso de las semillas, el límite establecido fue más laxo debido a la naturaleza de las muestras, menos ricas en microorganismos. En este caso, primero se eliminaron aquellos géneros que estuvieran presentes en menos del 50 % de las réplicas de cada genotipo. Tras esto, el microbioma esencial se calculó como aquellos géneros presentes en, al menos, 6 de los 10 genotipos.

Por último, también se compararon los miembros representados en al menos el 50 % de las réplicas de cada genotipo, con los miembros del microbioma esencial de la endosfera de los mismos cultivares, según lo descrito por Fernández-González y colaboradores (2019). Esto se realizó para los cultivares que estaban incluidos en ambos estudios, en este caso, Arbequina, Picual, Koroneiki, Uslu y Frantoio (Fernández-González et al., 2019).

### **M.5.5.7. Predicción de funciones metabólicas mediante FAPROTAX.**

La herramienta FAPROTAX v. 1.2.4 (*Functional Annotation of Prokaryotic Taxa*, Louca et al., 2016) permite aproximar las posibles funciones metabólicas llevadas a cabo por bacterias y arqueas a partir de datos de secuenciación del gen *16S rRNA*. FAPROTAX consiste en una base de datos construida manualmente que asigna funciones metabólicas u otras funciones ecológicamente relevantes a distintos taxones procariotas utilizando la literatura actual sobre cepas cultivadas. Esta herramienta se usó siguiendo el tutorial de los desarrolladores sobre los datos de las fincas OM y CM. Se utilizó el script proporcionado por los desarrolladores (*collapse\_table.py*), el cual compara el perfil taxonómico de nuestras muestras con la base de datos de FAPROTAX (también descargada de la web). Es necesario proporcionar a este script una tabla de OTUs/ASVs donde se incluya una columna con la clasificación completa a nivel taxonómico, separadas por puntos y comas. Este script está desarrollado en Python y se ejecutó en una distribución Ubuntu 20.04.2 LTS. El resultado devuelve la abundancia de las diferentes funciones predichas, así como los microorganismos responsables de las mismas. Con estas abundancias, se determinaron las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada función metabólica utilizando una prueba de Wilcoxon con corrección de los valores de  $p$  mediante Benjamini-Hochberg FDR.

### **M.5.5.8. Análisis de la interacción microbiana por redes de coocurrencia.**

Dentro de un ecosistema, existe una estrecha relación entre sus miembros por medio de una serie de interacciones, como la predación, competencia y mutualismo, interviniendo en el ensamblaje de la comunidad e influyendo en su funcionamiento. Por tanto, el conocimiento sobre la composición de una comunidad microbiana puede verse ampliamente enriquecido si se aborda el estudio de las relaciones entre sus individuos. Esta información se puede inferir mediante el cálculo de correlaciones entre las abundancias de los diferentes taxones, lo que se conoce como redes de coocurrencia. Así, el estudio de las redes de coocurrencia permite identificar patrones y relaciones entre diferentes elementos (genes, especies o ASVs en nuestro caso) que de otra manera no serían evidentes (Deng et al., 2012).

Si bien existen múltiples métodos para computar este tipo de redes, el uso de correlaciones está ampliamente extendido debido a su facilidad de computación y uso, así como su mayor robustez. Sin embargo, no todas las correlaciones que se calculen son estadísticamente significativas. Estas se suelen elegir en base al valor de  $p$  asociado, así como al valor del índice de correlación, que indica el grado de correlación (débil o fuerte) entre los individuos analizados. En relación a esto, surge la problemática sobre la elección de un valor límite a partir del cual las correlaciones no se consideren significativas. Esta elección suele ser bastante arbitraria, lo que dificulta la interpretación y comparación de resultados. En relación a esto, Deng y colaboradores (2012) desarrollaron un método para la elección automatizada de este límite, con el algoritmo *Random Matrix Theory* (RMT). Este se basa en un proceso iterativo donde se va aumentando el límite en el coeficiente de correlación. En cada paso, se calcula la distribución que siguen los datos de esta matriz. En base a esta teoría, los datos deberían seguir una distribución de Poisson. En el momento en el que los datos sigan dicha distribución, se termina la iteración y se elige el valor de corte para el coeficiente de correlación empleado (Deng et al., 2012; Luo et al., 2007).

De esta manera, Deng y colaboradores (2012) integraron esta aproximación en una herramienta online llamada MENAP (<http://ieg4.rccc.ou.edu/mena/login.cgi>) que permite la construcción y el análisis completo de redes de coocurrencia microbiana, desde la obtención de las correlaciones hasta el análisis de sus propiedades topológicas. En este estudio, las redes de coocurrencia fueron usadas con las muestras de las fincas OM y CM. Estas fueron analizadas a nivel de ASV y el protocolo seguido fue el siguiente:

- Se prepara la tabla de ASVs para cada grupo de muestras con el formato requerido por los desarrolladores de MENAP. Para ello, se fusionaron los ASVs de bacterias y hongos en una misma tabla, añadiendo un sufijo al nombre del ASV de manera que se distinga su procedencia. Además, se elimina la taxonomía y se guarda en otra tabla para futuros análisis. La columna con los ASVs debe ser renombrada con "ID". Por último, se eliminan los ASVs cuya abundancia sea nula para ese tratamiento.
- La tabla obtenida es cargada en la web (<http://ieg4.rccc.ou.edu/mena/login.cgi>) tras haber iniciado sesión como usuario.
- Se selecciona la opción *construct the network* y se dejan los parámetros por defecto, utilizando el índice de correlación de Pearson y eliminando aquellos ASVs que tuvieran una prevalencia menor al 50 %.
- Tras esto, comienza el proceso del algoritmo RMT y se muestra el límite calculado para los índices de correlación. Se eligió el valor por defecto. También se indicó que se usara la opción iDIRECT, recientemente desarrollada por Xiao y colaboradores (2022) para permitir discernir relaciones indirectas de las directas. A partir de estos datos, se selecciona *construct the network* (Xiao et al., 2022).
- Una vez construida la red, se vuelve al menú principal y a la opción de analizar las redes. Aquí se encuentran varias opciones. Por un lado, se calcularon las propiedades globales de la red y se utilizó la opción de *Module Separation and Modularity calculation* para obtener los nodos de la red y la modularidad de la misma. En concreto, se usó el algoritmo por defecto (*greedy modularity optimization*).

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Por último, gracias a la opción *Output for the Cytoscape Software*, se obtuvieron archivos preparados para poder hacer la representación gráfica de la red en Cytoscape v3.10.0 (P. Shannon et al., 2003).
- Este software se utilizó a través de R con el paquete RCy3 (Gustavsen et al., 2019). La representación gráfica se hizo agrupando los nodos según el módulo al que pertenecían en una geometría circular.

Los nodos (ASVs en nuestro caso) de una red pueden influir de manera diferente en las características topológicas de la misma según la conectividad que presenten con otros nodos. Así, su papel en la red se puede definir en base a dos parámetros: la conectividad intramódulo ( $Z_i$ ) y la conectividad entre módulos ( $P_i$ ) (Olesen et al., 2006). De acuerdo con estos valores, podemos clasificar los nodos en cuatro categorías que se relacionan con sus roles ecológicos en el ecosistema, siguiendo lo propuesto por Olesen y colaboradores (2006):

- *Network hub* ( $Z_i > 2,5, P_i > 0,62$ ). Se trata de aquellos nodos que se encuentran altamente conectados dentro de su módulo y con nodos de otros módulos, por lo que suponen una pieza central para la estructuración de la red. Se aproximan a especies supergeneralistas.
- *Module hub* ( $Z_i > 2,5, P_i \leq 0,62$ ). Estos nodos presentan una alta conectividad dentro de su módulo, pero no fuera de él, por lo que son de importancia para la conectividad con sus nodos vecinos. Se podrían considerar especies generalistas.
- *Connector* ( $Z_i \leq 2,5, P_i > 0,62$ ). Corresponde con nodos que conectan módulos entre sí, pero que no se encuentran muy conectados dentro de su propio módulo. Se podrían considerar especies generalistas.
- *Peripheral* ( $Z_i \leq 2,5, P_i \leq 0,62$ ). Presentan pocas conexiones tanto dentro de su módulo como con módulos vecinos. Pueden representar especies especialistas.

Así, los valores proporcionados por MENAP fueron introducidos en R y se utilizó un script propio para obtener la clasificación de los nodos en estas categorías.

### **M.6. DESARROLLO DE UNA LIBRERÍA DE FUNCIONES EN R Y TUTORIAL ASOCIADO**

El software R permite la creación de librerías o paquetes de funciones que pueden ser descargadas por cualquier usuario. Estas librerías son las unidades fundamentales para garantizar la reproducibilidad del código y facilita el intercambio de conocimiento entre los usuarios. Una librería en R contiene el código de las funciones, así como una detallada documentación sobre el funcionamiento de las mismas, incluyendo ejemplos. También puede incluir datos que pueden ser usados para comprobar la funcionalidad del código (Marwick et al., 2018). Todo esto hace que la creación de librerías no sólo sea interesante para compartir información con otros usuarios, sino también para estructurar y automatizar los flujos de trabajo individuales.

De esta manera, debido al frecuente uso durante el período de esta Tesis Doctoral de análisis bioinformáticos para el estudio de comunidades microbianas, se consideró de gran interés y utilidad desarrollar un paquete de R que contuviera funciones específicas para automatizar ciertos procesos, así como un tutorial en línea que ofreciera un flujo de trabajo ordenado, donde se integren de manera detallada todas las diferentes herramientas que empleamos en el análisis de este tipo de datos. La librería de funciones creadas se puede encontrar bajo el nombre de Micro4all y el resumen de su funcionamiento se publicó recientemente (Wentzien et al., 2023).

Para el desarrollo de la librería, se siguieron las recomendaciones de los desarrolladores de R (Marwick et al., 2018). En primer lugar, fue necesario instalar un software de control de cambios, en este caso, el software más usado para estos fines es GitHub (<https://github.com/>). Este permite almacenar y controlar las versiones del paquete creado, por lo que cualquier cambio que se realice puede ser detectado y revertido cuando se desee. Además, también facilita la colaboración, ya que diferentes usuarios pueden modificar el mismo paquete de manera conjunta. De hecho, cualquier usuario que utilice el paquete también puede generar preguntas o solicitudes de cambio, que pueden ser o no aceptadas por los desarrolladores del paquete, lo que permite la fácil comunicación dentro de la comunidad científica. Otra gran ventaja es

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

que GitHub proporciona un repositorio para alojar librerías de R, por lo que cualquier usuario de Internet tiene acceso a los mismos y puede instalarlos fácilmente. La instalación y uso de GitHub es posible dentro de RStudio (RStudio Team, 2020), siguiendo los siguientes pasos:

- Crear una cuenta online en GitHub.
- Descargar GitHub en el siguiente enlace, <https://gitforwindows.org/>.
- Tras la instalación, es necesario abrir la línea de comandos de GitHub, *git cmd*, en la barra de búsqueda.
- Se introducen los siguientes comandos para establecer el perfil de usuario:

```
git config --global user.name "Your name here"  
git config --global user.email your\_email@example.com.
```

Una vez instalado el controlador de cambios, se procede con la creación del paquete. Los pasos seguidos fueron:

- Crear el paquete en un directorio que no incluya otro proyecto de R o librería, utilizando la función *create\_package* del paquete DevTools (Wickham, 2021). Este paquete incluye un conjunto de funciones que facilitan y automatizan la creación de librerías en R. Esta función crea un nuevo proyecto de R en el directorio indicado donde se alojará el nuevo paquete y proporciona una estructura básica para el desarrollo del mismo.
- Una vez creado el proyecto y el paquete, es necesario enlazarlo con su respectivo repositorio en GitHub. Para ello, es necesario acceder a *Tools > Version Control > Project Setup*. Dentro de esta opción, se selecciona *Version control system: Git*, tras esto, *initialize a new git repository for this project*. Por último, es necesario usar la función *use\_git* del paquete DevTools.
- Las funciones que se quisieron incluir (explicadas detalladamente más adelante en este apartado), fueron creadas e introducidas en el paquete. Para ello, se utilizó la función *use\_r* aportándole el nombre de la función, la cual crea un documento con extensión *.R* en la carpeta *R/* del directorio de la librería. En este nuevo documento, se incluye la definición de la función creada.

- Una vez creada una función, es necesario probar su comportamiento en el entorno de R. Para ello, se utiliza la función *load\_all*, que carga las funciones creadas y permite su uso sin necesidad de compilar y cargar el paquete mediante *library()*.
- Cada vez que se genera un cambio o nueva función, es necesario incluir estos como comentarios en GitHub. Esto se realiza en la pestaña correspondiente de *RStudio*. Se selecciona el cambio realizado y se hace click en *Commit*. En la pestaña emergente, se selecciona de nuevo el cambio, se escribe un comentario explicativo asociado al mismo y se selecciona *Commit* y, por último, la opción *push*, para enviar estos cambios al repositorio de GitHub.
- Al añadir una nueva función, puede que existan errores al verse integrada dentro del paquete, por lo que es conveniente usar la función *check*, función que detecta e informa sobre problemas relacionados con la construcción del paquete.
- Además, es necesario documentar cada función para que incluya una explicación clara de su funcionamiento y que pueda ser consultada por cualquier usuario que descargue el paquete. Para ello, se abre el archivo *.R* de la función. Se coloca el cursor sobre la definición de la función y se selecciona *Code > Insert roxygen skeleton*. Esto permite introducir un esquema de tipo *Roxygen* que facilita la creación de la documentación. Cada uno de los apartados son rellenados con la información requerida. Una vez finalizado, se guardan los cambios del archivo y se crea el documento mediante el uso de la función *document*.
- Por otra parte, es necesario realizar otra serie de cambios para el paquete. Existe un documento llamado *description* que incluye información general del paquete, como el título, descripción y autoría. Este archivo se puede modificar manualmente a través de *RStudio*.
- Se creó una licencia de tipo MIT para dar derechos de *copyright* a los autores, utilizando la función *use\_mit\_license*.
- Por último, es conveniente crear códigos de prueba para cada función, que son ejecutados cuando se utiliza el comando *check* y que permiten comprobar que el resultado de la función es el esperado. Esto se puede conseguir creando

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

archivos de prueba con las funciones *use\_testthat* y *use\_test*. En el archivo creado se introduce el código correspondiente.

- Muchas de las funciones incluidas en Micro4all utilizan funciones de otros paquetes. Para incluir estos paquetes durante la instalación de Micro4all, se usó la función *use\_package* aportando el nombre del paquete, de manera que se incluya en el apartado *Imports* del archivo *description*.
- Para ciertas funciones, se quiso proporcionar al usuario con datos de ejemplo que puedan ser usados si se quiere probar la funcionalidad del paquete. Esto se hizo guardando los datos desde R utilizando la función *use\_data*. Estos datos también se deben documentar, como se hizo con las funciones, utilizando el objeto que se ha asociado a estos datos en la carpeta */R*.
- Se creó un archivo *README.Rmd* que constituye la página de inicio y bienvenida del paquete en la Web. Para crear este documento, se usó la función *use\_readme\_rmd*. El documento generado se completa utilizando lenguaje del tipo R Markdown. Para generar el documento que aparecerá en la web del paquete, es necesario utilizar la función *build\_readme*.
- Una vez se finalizó el proceso, se utilizó de nuevo la función *check* y se instaló el paquete mediante *install*.

Para completar el uso del paquete, también se desarrolló una página web asociada al mismo con un tutorial detallado, que no solo incluye el uso de las funciones del paquete, sino también el flujo de trabajo completo que llevamos a cabo en nuestro equipo de investigación para el análisis de microbiomas mediante secuenciación masiva de amplicones de regiones génicas e intergénicas comúnmente empleadas como marcadores taxonómicos en ecología microbiana. Para crear esta página web, se utilizó el siguiente protocolo:

- En primer lugar, se inicia el uso del paquete *pkgdown* (incluido dentro de DevTools) a través de la función *use\_pkgdown*. Esto genera una estructura básica para la creación de la página web.
- Para el tutorial asociado, se usó el lenguaje Rmarkdown, que permite combinar ejecución de código y texto en un mismo documento.

- Una vez redactado, es necesario procesar el lenguaje utilizado para generar el documento del tutorial. Esto se hizo mediante la función del paquete `rmarkdown` `render`, incluyendo como argumentos el archivo `.Rmd` a exportar y creando un nuevo entorno (`envir=new.env()`). Este documento debe ser almacenado en la carpeta `/docs/tutorial` para que sea publicado de manera adecuada por GitHub al construirse la web asociada al paquete.
- Una vez renderizado este documento, hay que construir la web asociada al paquete con las modificaciones incluidas. Para ello, se utiliza la función `build_site` del paquete `pkgdown`. Las modificaciones creadas se cargan en GitHub.

Como se ha comentado anteriormente, dentro de esta librería se incluyeron diversas funciones. La documentación de las funciones y los datos se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://rdr.io/github/nuriamw/micro4all/man/>. A continuación, se presentan las funciones incluidas en esta librería junto con la explicación de su funcionamiento. Cabe destacar que, para una descripción más detallada a nivel estadístico y de flujo de trabajo entre diferentes pruebas, se recomienda remitirse al Apartado M.5.

### M.6.1. Funciones para el filtrado de secuencias

Para facilitar el filtrado de las secuencias según lo propuesto por Bokulich y colaboradores (2013), se desarrolló la función `MockCommunity`. Esta función está diseñada para leer una tabla de ASVs/OTUs, donde los ASVs/OTUs correspondan con las filas. En las columnas se muestra la clasificación a diferentes niveles taxonómicos de dichos ASVs/OTUs, seguido de las lecturas obtenidas para cada muestra. Se requiere que las muestras de la comunidad sintética incluyan en su nombre la palabra `MOCK` para poder ser reconocidas por la función. También se debe proporcionar una tabla con la composición taxonómica de la comunidad sintética en columnas. Esta función permite calcular un valor de corte basado en la comunidad sintética incluida en la secuenciación y eliminar los ASVs que queden por debajo de dicho valor de corte. Para calcular este valor de corte, la función compara los resultados de secuenciación de la comunidad sintética (clasificación de los ASVs) con la composición real de la misma (proporcionada

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

en formato tabla). Si se encuentra un ASV que no corresponde con la composición de la comunidad, se informa al usuario de los datos de este ASV (nombre, clasificación y porcentaje de secuencias) y se le pregunta si desea utilizarlo para establecer o no el corte. Si se contesta que no, la función busca el siguiente ASV extraño a la comunidad y vuelve a preguntar al usuario. Una vez se decida que sí, la función elimina los ASVs de las demás muestras que supongan menos del corte establecido y devuelve una tabla sin las muestras de la comunidad sintética. Para más detalle, véase el Apartado M.5.4.

### M.6.2. Funciones para el análisis de diversidad $\alpha$

Las funciones aquí presentadas permiten la realización de pruebas estadísticas para índices de diversidad  $\alpha$ . Los datos que reciben estas funciones deben seguir una estructura específica, común a todas ellas. Así, la entrada debe ser una tabla con variables como columnas y muestras como filas, siendo las demás columnas los metadatos. Los metadatos serán usados por el usuario para indicar a la función el agrupamiento a seguir en las muestras. A continuación, se muestra una tabla ejemplo en la Tabla M5.

**Tabla M5. Tabla de ejemplo de la entrada de datos para las funciones del paquete *Micro4all* centradas en el análisis de diversidad  $\alpha$ .** Los metadatos aportan información sobre el posible agrupamiento de las muestras para los modelos estadísticos, en este caso, L1\_1 corresponde con la réplica 1 de la localización 1.

Índices de diversidad y riqueza			Metadatos	
Riqueza observada	Índice de Shannon	Inversa de Simpson	Muestras	Localización
337	4,13	21,14	L1_1	Localización 1
186	3,56	10,58	L1_2	Localización 1
215	3,52	10,80	L2_1	Localización 2
219	3,60	10,83	L2_2	Localización 2

Las funciones desarrolladas se indican a continuación:

- *Shapiro*. Esta función permite realizar un test de normalidad de Shapiro-Wilk para múltiples variables, en nuestro caso, se trata normalmente de índices de diversidad  $\alpha$ . De esta manera, no es necesario ejecutar esta prueba de manera individual para cada índice, sino que, al indicarle el número de índices a analizar, la función repite el test tantas veces como sea necesario. Esto se consigue gracias a la utilización de un bucle *for* (estructura de control que permite iterar un número determinado de veces un código), sobre la función *shapiro.test* del paquete *stats*.
- *Levene.test.alpha*. Esta función se encarga de verificar la homogeneidad de varianza entre grupos de muestras implementando un iterador *for* que permite realizar la prueba sobre varias variables respuesta, como, por ejemplo, índices de diversidad  $\alpha$ . Se basa en la función *leveneTest* del paquete *car* (Fox & Weisberg, 2016).
- *BalancedAnova*. Esta función ajusta un modelo de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para varias variables o índices de manera iterativa. Un análisis de tipo ANOVA permite evaluar la hipótesis nula de que las medias de dos o más poblaciones sean iguales. Esto se puede llevar a cabo con la función *aov* del paquete *stats*, aportando la variable a analizar (por ejemplo, un índice de diversidad  $\alpha$ ) y un modelo que permita aglutinar las muestras en diferentes grupos (por ejemplo, localizaciones o fincas). Esta función se implementa en *BalancedAnova* de manera que se realice sobre las diferentes variables aportadas, como pueden ser diferentes índices de diversidad. La función devuelve el resultado de un test de ANOVA balanceado para todas las variables respuesta proporcionadas. En este caso, el ANOVA realizado se basa en grupos con el mismo número de muestras.
- *UnbalancedAnova*. Esta función permite realizar un análisis de varianza para número de muestras desigual, utilizando el método de análisis de varianza tipo III. Su funcionamiento es similar al explicado en la función anterior (*BalancedAnova*).

- *Kruskal.Wallis*. Esta función se basa en la realización de un test de Kruskal-Wallis sobre múltiples variables respuesta. Se trata de un test similar al ANOVA en cuanto a la hipótesis a evaluar, pero que está adaptado para datos no paramétricos, principalmente la falta de distribución normal de dichos datos. Se utiliza también en caso de heterocedasticidad en los datos, aunque ningún test estadístico está realmente bien adaptado a la falta de homocedasticidad. Se basa en el uso de la función *kruskal.test* del paquete *stats*.

### M.6.3. Funciones para pruebas *post-hoc* (comparaciones dos a dos)

Cuando se realizan comparaciones entre múltiples grupos, es necesario el uso de pruebas *post-hoc* para discernir los pares de grupos con diferencias estadísticamente significativas. Así, se desarrollaron diversas funciones con este propósito, cuyo formato de datos aceptado corresponde con lo detallado en la Tabla M5:

- *dunnT*. El uso de los test de tipo ANOVA y Kruskal-Wallis permite conocer la significancia estadística de la diferencia en las medias de tres o más grupos. Sin embargo, no aporta información sobre qué grupos son diferentes entre sí. Para ello, es necesario realizar otro tipo de pruebas, conocidas como pruebas *post-hoc*. En este caso, la prueba de Dunn es un *post-hoc* no paramétrico. La función *dunnT* hace uso de *dunn.test* del paquete *dunn.test* (Dinno, 2022) para calcular la prueba de Dunn de comparaciones múltiples a lo largo de grupos (usando sumas de rangos), incorporando un bucle *for* que permite iterar a lo largo de múltiples variables de interés (por ejemplo, índices de diversidad  $\alpha$ ). Esta prueba sería la más adecuada para realizar tras el uso de Kruskal-Wallis debido a que se basa en el cálculo de rangos de la misma manera que Kruskal-Wallis (Dinno, 2015).
- *Tukey.test*. La prueba de Tukey se trata de un *post-hoc* paramétrico. Esta función se basa en *TukeyHSD* y *HSD.test* de los paquetes *stats* y *agricolae* para realizar comparaciones múltiples entre grupos. La función realiza esta prueba de manera iterativa sobre las variables proporcionadas (como pueden ser índices de diversidad  $\alpha$ ).

- *Wilcoxon.test*. Esta función se basa en la prueba de Wilcoxon, un *post-hoc* no paramétrico que se suele emplear tras la prueba de Kruskal-Wallis. Así, esta prueba se implementa en la función *Wilcoxon.test* gracias al uso de la función *parwise.wilcox.test* del paquete stats. Su funcionamiento se integra en un bucle *for* que permite iterar sobre múltiples variables, es decir, realizar las comparaciones múltiples entre grupos para todas las variables respuesta proporcionadas.

### M.6.4. Funciones para el análisis de diversidad $\beta$

Las funciones aquí presentadas permiten aplicar diferentes pruebas estadísticas relacionadas con la diversidad  $\beta$ . Todas ellas trabajan con un objeto de tipo phyloseq y los detalles de su funcionamiento se indican a continuación:

- *Permanova*. La función aquí descrita permite realizar un análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) con múltiples métricas de diversidad  $\beta$ . De esta manera, se puede obtener más rápidamente el resultado de esta prueba estadística con diferentes métodos de cálculo de distancias o disimilitudes entre grupos de muestra, permitiendo la comparación entre resultados. Este test también está adaptado para datos no paramétricos. Esta función de Micro4all se basa en el uso de *adonis2* del paquete vegan, que permite analizar la significancia de la diferencia en la distribución de dos o más grupos de objetos.
- *Betadispersion*. Tal y como se explicó detalladamente en el Apartado M.5.5.2, un resultado estadísticamente significativo de una prueba PERMANOVA no asegura por sí mismo la existencia de una diferencia significativa entre los centroides de los grupos de muestras analizados. Así, puede ocurrir que esta prueba sea significativa si los grupos de muestras poseen diferentes dispersiones en sus datos, a pesar de que sus centroides no difieran y las muestras solapen en un gráfico de ordenación. Por ello, además de un PERMANOVA, es necesario realizar una prueba de beta dispersión. La función *Betadispersion* de Micro4all ofrece la ventaja de incluir en una única función todos los pasos necesarios para llevar a cabo esta prueba, siendo estos el cálculo de distancias o disimilitudes matriciales sobre un objeto de clase phyloseq (utilizando la función *distance*), el análisis de

homogeneidad multivariante de dispersiones de grupo cada grupo (mediante la función *betadisper* de *vegan*) y la permutación de estos datos (mediante la función *permutest*). Además, permite realizar de manera simultánea esta prueba con múltiples medidas de distancia o disimilitud.

- *PairwiseAdonisFun*. Gracias a esta función, basada en *pairwise.adonis* del paquete *PairwiseAdonis*, se permite realizar un test de múltiples grupos (*post-hoc*) para poder analizar las diferencias entre pares tras obtener un PERMANOVA estadísticamente significativo. Esta función también incorpora el cálculo con diferentes matrices de distancia o disimilitud.

### M.6.5. Funciones para análisis de abundancias diferenciales

Existen diversos métodos para el análisis de abundancias diferenciales, orientados a conocer aquellos taxones cuya abundancia varíe entre tratamientos. En esta Tesis Doctoral, el método seleccionado fue el de ANCOMBC, debido a que su desarrollo se llevó a cabo de manera específica para datos de metataxonomía, atendiendo a las particularidades de este tipo de datos. Así, para facilitar el uso de esta herramienta, dentro de *Micro4all* se desarrolló la función *ancomloop*. Esta función se basa en el paquete ANCOMBC, en concreto, en su función *ancombc*. Permite realizar un análisis de abundancia diferencial entre taxones, basándose en un método diseñado específicamente para datos composicionales. Cuando se comparan más de dos grupos de muestras, la función original del paquete ANCOMBC no permite realizar todas las posibles combinaciones de grupos, ya que solo compara el primer grupo frente a los restantes. Esto supone un gran inconveniente y aumento del tiempo de computación para el usuario, ya que es necesario modificar el objeto de entrada de la función cada vez que se quieran obtener las demás combinaciones. Así, en la función de *Micro4all*, se automatiza este proceso para permitir realizar las comparaciones entre todos los grupos proporcionados.

## M.7. OBTENCIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS DE LA ENDOSFERA DEL OLIVO.

### M.7.1. Medios de cultivo y antibióticos

Los medios utilizados para el cultivo de microorganismos se detallan a continuación. Todos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión (por encima de la presión atmosférica) durante 20 min. Aquellos medios que se esterilizaron de manera diferente se detallan junto a su composición. Además, en caso de que se emplearan en su estado sólido, en cada medio se añadió agar al 1,5 % (p/v).

#### Medio LB (Luria-Bertani, Bertani, 1951)

- NaCl – 5 g
- Triptona – 10 g
- Extracto de levadura – 5 g
- Agua destilada – Hasta 1 L
- pH ajustado a 7,0

#### Medio TY (Tryptone-Yeast, Beringer, 1974)

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,5 g
- Triptona – 5 g
- Extracto de levadura – 3 g
- Agua destilada – Hasta 1 L
- pH ajustado a 6,8

#### Medio TSA (Tryptic Soy Agar, Bacto Difco™ biosciences)

- Digerido pancreático de caseína – 17g
- Digerido enzimático de soja – 3 g
- D-Glucosa – 2,5 g
- NaCl – 5 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,5 g
- Agua destilada – Hasta 1 L

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- pH ajustado a 7,3

### **Medio SCA (Starch Casein Agar, Küster & Williams, 1964).**

Este medio fue autoclavado a 115 °C durante 30 min. Se usó una temperatura menor para evitar la caramelización del almidón.

- Almidón de patata – 10 g
- Caseína – 0,3 g
- KNO<sub>3</sub> – 2 g
- MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,05 g
- NaCl – 2 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2 g
- CaCO<sub>3</sub> – 0,02 g
- FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,01 g
- Agua destilada – Hasta 1 L
- pH ajustado a 7,2

### **Medio SCA'**

La concentración de los componentes fue la misma que en el medio SCA pero añadiendo una cantidad de NaCl aumentada a 20 g.

### **Medio HH' (medio modificado selectivo de Hagedorn-Holt, Fernández-González et al., 2017; Hagedorn & Holt, 1975).**

- Caldo de Soja Tríplica (TSB) – 4 g
- Extracto de levadura – 2 g
- NaCl 30 g
- Agua destilada – Hasta 1 L

### **GA (Glicerol arginina agar, El-Nakeeb & Lechevalier, 1963)**

- Arginina monoclorhidrato – 1g
- Glicerol – 12,5 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1 g
- NaCl – 1 g

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,5 g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  – 0,01 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,001 g
- pH ajustado a 7,1.

### **Medio ISP-2 (DSMZ)**

- Extracto de levadura (Difco) – 4 g
- Extracto de malta (Difco) – 10 g
- Dextrosa (Difco) – 4 g
- Agua destilada – hasta 1 L
- pH ajustado a 7,2

### **Medio Nutrient Agar (NA)**

- Extracto de carne – 1 g
- Extracto de levadura – 2 g
- Peptona – 5 g
- NaCl – 5 g
- pH ajustado a 7,2

### **Gauze's syntehtic medium NO.1**

- Almidón de patata – 20 g
- $\text{KNO}_3$  – 1 g
- NaCl – 0,5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,5 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 10 mg
- Agua destilada – Hasta 1 L
- pH ajustado a 7,4

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### Medio mínimo

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,3 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,3 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,15 g
- $\text{CaCl}_2$  – 0,05 g
- $\text{NaCl}$  – 0,05 g
- Manitol – 10 g

Además, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las siguientes diluciones acuosas:

- Biotina – 0,002 g/mL
- $\text{Cl}_3\text{Fe}$  – 0,06 g/mL
- Ácido pantoténico – 0,001 g/mL

El pH fue ajustado a 6,8

### Medios con extracto de raíz

Se prepararon dos tipos de medios que incluían como fuente de nutrientes un extracto de raíz de olivo: medio ISP-2 (cuya composición se indicó anteriormente) y agar-agua (WA, que no incluye ninguna fuente de nutrientes). Además, cada medio se preparó por duplicado, añadiendo el extracto de raíz de manera diferente. Por una parte, se añadió el extracto de raíz crudo y se esterilizó en el autoclave. Por otra parte, se filtró este extracto con filtros de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{M}$  y se añadió posteriormente al medio autoclavado. De esta manera, se quiso comprobar si era realmente necesaria la filtración y si se generaba un crecimiento diferente debido a un acceso distinto a los nutrientes en el medio (Eevers et al., 2015).

Para generar el extracto de raíz, las raíces de olivo del genotipo Picual fueron esterilizadas superficialmente como se indica en el Apartado M.2.2 y fueron congeladas a  $-80$  °C. Posteriormente, estas fueron pesadas y liofilizadas. Para la liofilización, el envase de liofilización fue limpiado con etanol para mantener lo mejor posible la esterilidad. En una campana de flujo laminar, se transfirieron las raíces al envase del liofilizador de manera rápida para evitar la descongelación de las mismas. Este envase se cubrió con Parafilm y se perforó antes de ponerlo en el liofilizador. Se dejaron

lío filizando durante 48 horas. Una vez finalizado el proceso, se procedió a su molido en un molino mezclador MM400 Retsch (Haan, Alemania). Primero, las raíces fueron cortadas en esterilidad y se colocaron en recipientes metálicos de 35 mL del molino. Dentro del mismo se colocaba una bola de acero de diámetro 20 mm previamente lavada con etanol. El molido se realizó a 30 Hz durante un minuto. Finalmente se obtuvieron 9,2 gramos de polvo de raíz. Este polvo se diluyó en 45 mL de  $MgSO_4$  10 mM y se añadió agua destilada estéril hasta un volumen de 100 mL. El resultado fue un líquido muy espeso, por lo que se decantó 4 veces para obtener un extracto que pudiera ser filtrado. Antes del filtrado, 50 mL fueron usados como extracto crudo y 50 mL se centrifugaron a 3.000 g durante 10 min en una Eppendorf Centrifuge 5810R con un rotor A-4-62. El producto de la centrifugación fue sometido a filtración con filtros de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ M y almacenado a 4 °C hasta su adición al medio ya esterilizado.

Para los medios a los que se añadiría el extracto filtrado, se prepararon 491 mL de cada uno (con los componentes calculados para 500 mL) de manera que al añadir el filtrado no se alterase el volumen final. Este fue añadido en condiciones de esterilidad a los medios tras el autoclavado. En el medio con el extracto crudo, este fue añadido antes de la esterilización en autoclave.

### **Antibióticos**

Los antibióticos usados en los medios de cultivo fueron cicloheximida y ácido nalidíxico. La cicloheximida se prepara en una solución de etanol y agua destilada estéril, en una proporción 1:1 (v/v). El ácido nalidíxico se prepara en una solución de NaOH 0,3M estéril. Los antibióticos fueron preparados a una concentración de 5 mg/mL cada uno (100x). Estos antibióticos se añadían a los medios estériles una vez enfriados sin llegar a solidificarse. El medio con antibióticos se extendía en placas antes de la solidificación del mismo.

### **M.7.2. Aislamientos dirigidos a la obtención de bacterias del género**

#### ***Actinophytocola***

##### **M.7.2.1. Aislamiento a partir de raíces tomadas del WOGC**

Para este aislamiento, se eligieron los cultivares de olivo que presentaron una mayor abundancia relativa del género *Actinophytocola* según lo descrito por Fernández-González y colaboradores (2019), siguiéndose el protocolo detallado por esos autores para el muestreo y almacenamiento de las raíces. Concretamente, las muestras provenían del WOGC y los cultivares seleccionados fueron los siguientes (en orden descendiente de abundancia relativa de *Actinophytocola* en la endosfera):

- i. Uslu.
- ii. Verdial de Vélez-Málaga.
- iii. Koroneiki.
- iv. Mavreya.
- v. Myrtolia.
- vi. Chemlal de Kabylie.
- vii. Arbequina.
- viii. Morrut.
- ix. Megaritiki.

Las raíces se esterilizaron superficialmente previamente a su triturado, tal y como se describió en el Apartado M.2.2. Las raíces fueron molidas en un mortero estéril de 9-12 cm de diámetro, agregando de 0,5 a 1 g de raíz en 10 mL de una solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. 100 µL del producto del macerado de cada muestra se guardaron en criotubos junto con 250 µL de glicerol en congeladores a -80 °C.

Para cada genotipo seleccionado, se hicieron 6 diluciones seriadas (de la 0 a la 10<sup>-5</sup>) de la muestra original y se sembraron por triplicado en tres medios diferentes: SCA, HH' y SCA'. El volumen de sembrado fue de 100 µL y se utilizaron bolas de vidrio estériles para la siembra. A cada medio se adicionó la cantidad correspondiente de antibiótico para obtener una concentración de cicloheximida final de 50 µg/mL y de ácido nalidíxico de 10 µg/mL.

Las placas se dejaron crecer a 28 °C durante un mes. Se prepararon dos nuevas placas para cada medio, sin incluir antibióticos, que fueron usadas para el repicado de las colonias que aparecían en las placas originales. Este repicado se llevó a cabo con palillos estériles. A partir de aquí, a las colonias seleccionadas se les extrajo el ADN, se realizaron PCRs del gen ribosomal *16S rRNA*, se secuenciaron mediante el método de Sanger desde un extremo del gen y se anotaron usando BLASTn para determinar el género bacteriano al que pertenecían. Estos protocolos se encuentran detallados en los Apartados M.4.4, M.4.5, M.4.9.1 y M.5.1, respectivamente.

Las cepas aisladas que resultaron de interés fueron almacenadas a largo plazo. Para ello, fueron crecidas en 3 mL de cultivo líquido, usando como medio de cultivo aquel en el que crecieron originalmente. Este cultivo se dejaba crecer durante 24-48 horas hasta alcanzar una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de 0,8 unidades. Una vez se observó el crecimiento deseado, se adicionaban 750  $\mu$ L de cultivo bacteriano en criotubos estériles que contenían 250  $\mu$ L de glicerol (agente crioprotector). Esto se realizaba por duplicado, de manera que se obtuviera un criotubo de reserva. Ambos se almacenaron a -80 °C. Por último, se secuenció también por el otro extremo del gen ribosomal mediante secuenciación Sanger para tener la secuencia casi completa, mayor a 1450 bp, y mejorar su clasificación, como se detalló en el Apartado M.4.9.1.

### **M.7.2.2. Enriquecimiento mediante desecación de las raíces de olivo con cloroformo**

Raíces del cultivar Verdial de Vélez-Málaga muestreadas del WOGC fueron seleccionadas para recibir un pretratamiento con cloroformo que permitiera aislar microorganismos potencialmente resistentes a sequía (Narváez-Reinaldo et al., 2010). El cloroformo es un agente que solubiliza las membranas celulares. Muchas bacterias resistentes a desecación producen moléculas como la trehalosa, la cual impermeabiliza su superficie y no es solubilizada por el cloroformo. Sin embargo, la trehalosa sí es soluble en agua, por lo que no se pudieron utilizar las muestras ya esterilizadas y trituradas que se tenían almacenadas, ya que se encontraban suspendidas en un tampón acuoso. De esta manera, la trehalosa estaría solubilizada y el cloroformo

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

actuaría también sobre las células resistentes a desecación. Por ello, estas raíces fueron esterilizadas superficialmente como se indicó en el Apartado M.2.2. En este caso, las raíces fueron trituradas con un protocolo diferente, que permitiera obtener fragmentos de raíz de un tamaño menor para un mejor acceso y efecto del cloroformo. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Cortar las raíces en fragmentos pequeños con un bisturí estéril.
2. Introducir los fragmentos en tubos de 1,5 mL estériles (con pinzas estériles).
3. Introducir en nitrógeno líquido durante un instante.
4. En cada tubo se introducen tres bolas de acero inoxidable de 5 mm de diámetro (Qiagen, Hilden, Alemania) que han sido esterilizadas previamente en el horno a 160 °C durante 2 horas.
5. Los tubos se agitan en un molino mezclador MM031 Retsch (Haan, Alemania) durante 6 min a 30 Hz.

El tratamiento con cloroformo se realizó de la siguiente manera:

1. Verter el polvo de raíz con las bolas en un en una placa de cristal estéril.
2. Aplicar cloroformo hasta cubrirlo.
3. Dejar actuando durante 60 min con la tapa puesta para evitar la evaporación del cloroformo y las posibles contaminaciones.
4. Verter el contenido en una miniplaca de Petri de vidrio estéril (diámetro de 50 mm).
5. Dejar secando en una campana de flujo laminar hasta que se evapora el cloroformo.
6. Rehidratar el suelo de la placa con 5 mL de solución de medio mínimo.

Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas en medio mínimo hasta la dilución  $10^{-3}$ . Las diluciones se sembraron por triplicado en los medios SCA y TSA, conteniendo cicloheximida a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La cantidad restante de polvo de raíz rehidratado se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### M.7.2.3. Pretratamientos y siembra con filtros de nitrocelulosa

Los aislamientos realizados anteriormente dieron lugar a la aparición de colonias de bacterias de rápido crecimiento, como *Streptomyces* o *Bacillus*. De esta manera, se decidió aplicar una serie de pretratamientos a las muestras diseñados para aislar actinobacterias que, por su lento crecimiento, son más difícilmente aislables y cultivables (Tiwari & Gupta, 2013). Estos pretratamientos se llevaron a cabo sobre muestras de raíces del cultivar Verdial de Vélez-Málaga que habían sido previamente tratadas con cloroformo (Apartado M.7.2.2). Además, también se utilizaron raíces del cultivar Mavreya. Estas fueron esterilizadas superficialmente y trituradas en un molino mezclador MM031 Retsch (Haan, Alemania) durante 6 min a 30 Hz, tal y como se detalló en el apartado anterior (Apartado M.7.2.2). Se procesó una cantidad suficiente de raíces de Mavreya para poder realizar los pretratamientos sobre raíces tratadas y no tratadas con cloroformo. Tanto para las raíces de Verdial como de Mavreya, también se llevó a cabo una siembra sin pretratamientos, pero utilizando filtros de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{M}$ , por lo que sólo las bacterias que formen micelio podrán crecer, ya que esta estructura les permite atravesar el filtro y alcanzar el agar. Por último, también se hicieron siembras sin aplicar ningún pretratamiento, para poder comparar el resultado de los mismos.

A continuación, se exponen los detalles de cada pretratamiento usado, así como el protocolo a seguir. Los pretratamientos que se aplicaron fueron dos. Por una parte, se aplicó el método de rehidratación-centrifugación para retener esporas móviles (Hayakawa et al., 2000) y, por otra parte, el método de tratamiento con SDS (0,05 %), extracto de levadura (6 %) y calor (Hayakawa & Nonomura, 1989), que promueve la germinación de las esporas de actinobacterias (gracias al extracto de levadura y al calor) y evita el crecimiento de bacterias del género *Bacillus* gracias a la inhibición del crecimiento de sus células vegetativas por acción del SDS. Los pasos que se llevaron a cabo se detallan a continuación:

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- **Pretratamiento con SDS (0,05 %) y extracto de levadura (6 %).** Como se explicó anteriormente, este método promueve la germinación de las esporas de actinobacterias (gracias al extracto de levadura y al calor) e inhibe el crecimiento de bacterias del género *Bacillus* gracias a la acción del SDS. Los pasos a seguir son:
  1. En un tubo Falcon estéril, se añaden 500  $\mu$ L de la muestra pretratada con cloroformo e hidratada y 4,5 mL de la solución con SDS al 0,05 % y extracto de levadura al 6 %. Se reparte en tubos de 1,5 mL.
  2. Se incuba a 40 °C durante 20 min.
  3. Se centrifuga durante 5 min a 12.200 g.
  4. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de tampón fosfato 5 mM.
  5. Se hacen sucesivos lavados del pellet por centrifugación. Se centrifuga 5 min a 12.200 g.
  6. Se descarta de nuevo el sobrenadante y se resuspende en 300  $\mu$ L. Se recupera todo en un mismo tubo.
  7. Hacer tres diluciones seriadas (hasta  $10^{-3}$ ) en tampón fosfato 5 mM y sembrar (50  $\mu$ L) por triplicado en SCA y GA suplementado con cicloheximida y ácido nalidíxico a una concentración de 50  $\mu$ g/mL. Esta concentración se aumentó debido a la poca eficacia del antibiótico en los experimentos anteriormente expuestos.
  8. Crecer a 28 °C durante 30 días.
- **Pretratamiento de rehidratación y centrifugación.** Este método permite retener esporas móviles. Los pasos a seguir son:
  1. En un tubo falcon estéril de 50 mL, se añaden 500  $\mu$ L de la muestra pretratada con cloroformo e hidratada y 4,5 mL de tampón fosfato 10 mM. Se mezcla bien y se reparten en tubos de 1,5 mL.
  2. Se incuba a 30 °C durante 90 min.
  3. Se centrifuga a 230 g durante 20 min.
  4. Se recoge el sobrenadante en un mismo tubo.

5. Hacer tres diluciones seriadas (hasta  $10^{-3}$ ) en tampón fosfato 10 mM y sembrar 50  $\mu$ L por triplicado en SCA y GA suplementados con cicloheximida y ácido nalidíxico a una concentración de 50  $\mu$ g/mL.
  6. Crecer a 28 °C durante 30 días
- Siembra en filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ M (Hirsch & Christensen, 1983). En este método se hace la siembra sobre un filtro de nitrocelulosa (que se proporciona estéril por el fabricante) que se coloca sobre una placa Petri. Tras un período de incubación, se retira el filtro y se dejan incubando de nuevo las placas. Con este método, las bacterias que forman micelio podrán atravesar el filtro, pero las demás bacterias no, de manera que, tras un período de incubación, estas podrían crecer en la placa. Los pasos a seguir son:
    1. Los filtros se manipulan con pinzas flameadas y se colocan en el centro de cada placa.
    2. Se hacen tres diluciones de la muestra tratada con cloroformo (hasta la  $10^{-3}$ ) en tampón fosfato 10 mM y se siembran en SCA 50  $\mu$ L repartidos en cuatro gotas en cada filtro.
    3. Se dejan incubar durante 7 días a 28 °C antes de quitar el filtro y dejarlos incubar durante otros 23 días.
  - **Siembra sin pretratamiento.** Se hicieron diluciones de las muestras pretratadas con cloroformo hasta la  $10^{-3}$  y se sembraron 50  $\mu$ L por triplicado en SCA y GA suplementados con cicloheximida y ácido nalidíxico a una concentración de 50  $\mu$ g/mL. Se incubó a 28 °C durante 30 días.
  - **Siembra sin cloroformo.** Las muestras de raíz de Mavreya fueron procesadas como se explicó anteriormente (mediante esterilización superficial y triturado en molino mezclador MM031 Retsch (Haan, Alemania) durante 6 min a 30 Hz, Apartado M.7.2.2) sin aplicar tratamiento con cloroformo, de manera que se tenga un control de este procedimiento. Se diluyeron en 5 mL de tampón fosfato 5 mM

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

para partir de las mismas condiciones. Se sembraron diluciones seriadas hasta la  $10^{-6}$  (50  $\mu$ L de cada una) por triplicado en los medios SCA y GA suplementados con cicloheximida y ácido nalidíxico a una concentración de 50  $\mu$ g/mL. Se incubó a 28 °C durante 30 días.

### M.7.2.4. Crecimiento oligotrófico

Con la intención de usar más aproximaciones para conseguir el aislamiento de cepas del género *Actinophytocola*, se quiso hacer una siembra a partir de la muestra congelada y pretratada con cloroformo del cultivar Verdial de Vélez-Málaga. En este caso, se utilizó un medio NA a diferentes diluciones, de manera que se cree un ambiente oligotrofo. La oligotrofia de los medios de cultivo se ha visto relacionada con el aislamiento diferencial de géneros de actinobacterias (Bartelme et al., 2020). En concreto, el NA se diluyó 10, 50 y 100 veces de su concentración original. La muestra de raíz de Verdial de Vélez-Málaga se diluyó tres veces de forma seriada, hasta la dilución  $10^{-3}$ , y se sembró por duplicado para cada una de ellas. Las placas se cultivaron a 28 °C durante 30 días.

### M.7.2.5. Screening masivo mediante PCR

Se quiso realizar un screening a gran escala de aislados mediante PCR específica para el gen *16S rRNA* de *Actinophytocola*. Para ello, se seleccionó el cultivar de olivo Uslu, ya que presenta una alta abundancia relativa de *Actinophytocola*. No fue necesario procesar las raíces, pues ya se tenía un extracto de las mismas almacenado en criotubos, que se obtuvieron tal y como se describió en el Apartado M.7.2.1, mediante esterilización superficial y triturado en mortero estéril, agregando de 0,5 g a 1 g de raíz en 10 mL de una solución de  $MgSO_4$  10 mM. A partir de este extracto, se hicieron 6 diluciones seriadas y se sembraron 10 réplicas de cada dilución en medio SCA con cicloheximida y ácido nalidíxico a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL. Se incubaron a 28 °C. Tras siete días de incubación, comenzaron a observarse colonias. Se repicaron en placas máster (primer pase) usando palillos estériles hasta alcanzar un número de 1.000 colonias.

Para la realización del screening, se hicieron PCRs de colonia mezclando en un mismo tubo de lisis 10 colonias, que se recogían de la placa máster con palillos estériles y se disolvían en agua destilada estéril para promover la lisis celular. La PCR se llevó a cabo con primers específicos del género *Actinophytocola*, así como de la especie *Actinophytocola oryzae*, diseñados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, tal y como se detalla en el Apartado M.4.10. En estas reacciones de PCR, se incluyó como control positivo el ADN extraído de la cepa tipo *Actinophytocola oryzae* adquirida de la colección DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Alemania). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0,8 %.

### **M.7.2.6. Aislamiento desde raíces del cultivar Picual**

Adicionalmente, en un nuevo intento de aislamiento, se tomaron raíces del cultivar Picual de olivo, durante el mes de junio en una parcela con tratamiento ecológico y sin riego, tras un periodo de más de 40 días sin lluvia, en la localidad de Otura (Granada). Las raíces de Picual se esterilizaron superficialmente según lo especificado en el Apartado M.2.2 y se almacenaron en tubos de 50 mL a -80 °C. A partir de estas muestras, se hicieron siembras en medios suplementados con extracto de raíz, con el fin de obtener unas condiciones de cultivo similares a las encontradas dentro de la raíz, donde proliferan los endófitos de *Actinophytocola*. Por otra parte, también se realizó una siembra en un medio general (TSA) a partir de muestra de raíz triturada y desecada al aire durante 24 horas en una campana de flujo laminar, de acuerdo a lo descrito por Narváez-Reinaldo y colaboradores (2010).

Para procesar las muestras, se pesaron 0,6 g de raíz y se trituraron en un molino mezclador MM400 Restch (Haan, Alemania). Se usó un recipiente de 35 mL con bolas de acero de 20 mm de diámetro, previamente limpiados con etanol. La raíz se cortó con bisturí estéril sobre una placa de Petri estéril. La muestra se añadió al recipiente, se colocó la bola de acero sobre la muestra y, posteriormente, se adicionó nitrógeno líquido con ayuda de un tubo Falcon. Se dejó que el nitrógeno se evaporase y se procesó en el molino a 30 Hz durante 1 min. Este proceso se realizó por duplicado. El polvo de raíz de uno de los ensayos se usó para el protocolo de desecación (24 h al aire en

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

campana de flujo laminar). Tras esto, las muestras desecadas y no desecadas se diluyeron en 1,5 mL de tampón fosfato 100 mM a pH 7. Para cada ensayo, se prepararon 4 diluciones seriadas (de la 0 a la  $10^{-3}$ ) y se sembraron tres réplicas de 50  $\mu$ L para cada una utilizando bolas de vidrio estériles. Estas siembras se realizaron tanto en ISP-2 con extracto crudo, ISP-2 con extracto filtrado, WA con extracto crudo, WA con extracto filtrado y TSA, suplementados con cicloheximida y nalidíxico a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL.

Estas placas se incubaron a 28 °C durante dos semanas y media. Las colonias que aparecían se repicaban con palillos estériles en placas máster tanto de TSA como de ISP-2, para asegurar el crecimiento. En total, se repicaron 32 colonias de cada medio con extracto de raíz (ISP-2 y WA) y 13 colonias del ensayo de desecación.

Sobre las colonias crecidas, se hizo PCR de colonia con primers generales del gen ribosomal *16S rRNA*, así como con el set de primers AphyF1/AphyR1 (diseñados durante esta Tesis Doctoral, según el Apartado M.4.10) y los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8 % para comprobar si se obtenían amplificadores que pudieran corresponder al género *Actinophytocola*.

### M.7.2.7. Aislamiento a partir de raíces preenriquecidas

Para este ensayo, se utilizaron las raíces de Picual (finca ecológica en Otura, Granada) ya esterilizadas superficialmente y almacenadas a -80 °C que se obtuvieron según lo descrito en el apartado anterior. Según Carro y colaboradores (2018), las raíces fueron preenriquecidas para activar el crecimiento de los endófitos antes de su procesamiento y sembrado. Esto se llevó a cabo sobre las raíces de 4 tubos de 50 mL congelados a -80 °C (raíces ya esterilizadas superficialmente) con un peso de aproximadamente 2 g de raíz por tubo. Con pinzas flameadas, se colocaron en matraces estériles de 250 mL. Se vertió Gauze's synthetic nº 1 hasta cubrir las raíces, se tapó con algodón y se dejó en agitación (170 rpm) a 30 °C durante cuatro días. Tras esto, se descartó el medio y se secaron con papel de filtro estéril. Se cortaron con bisturí estéril y se colocaron en tubos de 1,5 mL, obteniéndose 12 tubos con raíz con aproximadamente 0,5 g cada uno. Las muestras fueron procesadas en el molino

mezclador MM031 Retsch (Haan, Alemania) durante 6 min a 30 Hz, tal y como se indica en el Apartado M.7.2.2. Una vez obtenido el polvo, se añadieron 5 mL de tampón fosfato 5 mM y se repartió de nuevo en 12 alícuotas. A partir de estas muestras, se llevaron a cabo dos tratamientos: tratamiento con calor a 70 °C durante 24 horas y pretratamiento con SDS y extracto de levadura. Estos pretratamientos fueron combinados de la siguiente manera:

- La mitad de las muestras se sometieron al tratamiento por calor. Este tratamiento consistió en introducir las alícuotas en el horno a la temperatura indicada. Tras esto, 3 de los 6 tubos fueron a su vez tratados con el método de SDS y extracto de levadura. Así, las muestras obtenidas fueron llamadas **70 y 70SDS**.
- A la otra mitad de las muestras no se les aplicó el tratamiento con calor. De los 6 tubos, 3 se sometieron al tratamiento con SDS y extracto de levadura. Este procedimiento se realizó tal y como se indicó en el Apartado M.7.2.3, con la salvedad de que se resuspendió en 1,5 mL. Los tres tubos restantes no recibieron ningún tipo de tratamiento, por lo que sirvieron a modo de control. Así, las muestras obtenidas fueron llamadas **control y SDS**.

Paralelamente, en diferentes momentos del procedimiento se tomaron alícuotas de 100 µL de las muestras. Esto se hizo con el objeto de extraer ADN de las mismas y realizar PCR con los primers específicos de *Actinophytocola* (tanto de género como de especie). Así, se comprobaba si *Actinophytocola* era detectado en algún momento y realizar la siembra sólo de esas muestras. Así, las alícuotas se tomaron de los siguientes momentos:

1. Medio de preenriquecimiento tras incubación.
2. Control después de triturar y resuspender.
3. Tratamiento SDS, antes de realizar el tratamiento (después de la molienda).
4. Tratamiento SDS, antes de realizar el tratamiento (después de 24 horas a 4 °C).
5. Tratamiento SDS, después de realizar el tratamiento.
6. Tratamiento 70 °C, después de someter a temperatura.
7. Tratamiento 70 °C y SDS, después de los 70 °C y antes de hacer SDS.
8. Tratamiento 70 °C y SDS, después de los 70 °C y después de SDS.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

El ADN fue extraído siguiendo lo indicado en el Apartado M.4.4. Tras realizar las PCRs y comprobar el resultado en geles de agarosa al 0,8 %, se sembró tan solo el tratamiento con calor y SDS. Se hicieron 5 diluciones seriadas (de la 0 a la  $10^{-4}$ ) y se sembraron tres placas por dilución usando bolas de vidrio estériles. Además, por cada tubo de pretratamiento seleccionado, se sembraron 4 placas en las que se colocaban 25 gotas de 10  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-3}$ . De esta forma, se intentaba capturar la mayor diversidad bacteriana de las muestras. El medio usado fue medio mínimo (Gauze's synthetic medium nº 1) al que se le añadió 4 g de polvo de raíz por litro. Además, estaba suplementado con cicloheximida y ácido nalidíxico en una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### M.7.3. Experimentos de planta trampa

Con el objeto de obtener aislados de géneros con potenciales funciones promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), se diseñó un experimento de planta trampa para aislar bacterias noduladoras de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (*Ensifer*). Este ensayo se realizó ya que, según lo descrito por Fernández-González y colaboradores (2019), estos géneros estaban dentro de los 6 más abundantes en la endosfera de raíz de los árboles muestreados en el WOGC.

Los experimentos de planta trampa consisten en la inoculación de plántulas de especies de leguminosas con muestras que contengan bacterias noduladoras. A partir de los nódulos formados en la planta, se aíslan microorganismos que deben provenir de la muestra inoculada, ya que la maceta se siembra en completa esterilidad.

El inóculo se preparó tanto de extracto de endosfera como de rizosfera, ya que *Rhizobium* también fue encontrado en alta abundancia relativa en este compartimento. Las muestras seleccionadas fueron aquellas que, según el estudio de Fernández-González y colaboradores (2019), presentaron una mayor abundancia relativa de *Sinorhizobium* o *Rhizobium* en la endosfera. Así, *Morrut* fue el cultivar elegido para el aislamiento de *Sinorhizobium* y *Uslu* para el aislamiento de *Rhizobium*. Las muestras de suelo correspondían a las mismas utilizadas en el estudio de Fernández-González y colaboradores (2019) y que habían sido preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para las muestras de raíz,

se usaron las ya almacenadas como extracto en criotubos y que se obtuvieron del procesamiento descrito en el Apartado M.7.2.1, mediante esterilización superficial de la raíz y molido en un mortero estéril de 9-12 cm de diámetro, agregando de 0,5 g a 1 g de raíz en 10 mL de una solución de  $MgSO_4$  10 mM.

El uso de plantas trampas se basa en la especificidad de las bacterias noduladoras para colonizar, infectar y formar nódulos en especies concretas de plantas leguminosas. Por ello, tanto para *Sinorhizobium* como para *Rhizobium*, se trató de aproximar la especie mayoritaria presente en las muestras, de manera que se pudiera seleccionar una planta trampa específica. Esto se llevó a cabo mediante la generación de OTUs al 100 % de similitud, seleccionando los dos OTUs con mayor abundancia relativa y haciendo un BLASTn para obtener la especie con la que mejor alineaba la secuencia de dichos OTUs. De esta manera, las especies obtenidas fueron *Rhizobium leguminosarum viciae* (nodula *Pisum sativum*, guisante), *R. lusitanum* (nodula *Phaseolus vulgaris*, habichuela), *Sinorhizobium medicae* y *S. meliloti* (ambas nodulan *Medicago sativa*, alfalfa). También se seleccionaron bacterias como control positivo basadas en su especificidad de nodulación con cada una de las plantas hospedadoras. Estas fueron *Rhizobium leguminosarum sv. viciae* (USDA 2370<sup>T</sup>) (Albert Bernhard, 1889), *Rhizobium etli* CFN42 (DSMZ11541, DSMZ, Alemania) y *Sinorhizobium meliloti* AK21 (Ibragimova et al., 2006), respectivamente. Se utilizaron 24 plantas para la endosfera y 24 para la rizosfera de cada especie.

En primer lugar, las semillas fueron esterilizadas como sigue:

- Esterilización y germinación de semillas de *Medicago sativa* L. 'Victoria' (alfalfa):
  1. Sumergir las semillas durante 9,5 min en 2,5 %  $HgCl_2$  en un tubo estéril.
  2. Lavar 5-6 veces con agua destilada estéril.
  3. Dejar en imbibición durante 2 horas en agua destilada estéril.
  4. Colocar en placas de Petri con papel de filtro estéril.
  5. Añadir un 2,5 mL. de agua estéril para humedecer el papel.
  6. Dejar germinar a 28 °C durante 24 - 48 horas en oscuridad, hasta observar la aparición de la radícula.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Esterilización y germinación de semillas de *Pisum sativum* L. 'Partim' (guisante):
  1. Si las semillas comerciales presentan un color rosado debido al protector antifúngico, es necesario lavarlas con agua estéril hasta eliminar el color.
  2. Inmersión en etanol 96 % durante 3 min.
  3. Lavar 5-6 veces con agua estéril.
  4. Imbibición durante 2-3 horas en agua destilada estéril.
  5. Germinar semillas tal y como se indicó para las semillas de alfalfa.
- Esterilización de semillas de *Phaseolus vulgaris* F-15 (habichuela):
  1. Lavar con agua estéril.
  2. Sumergir en etanol 96 % durante 5 min.
  3. Lavar 3 veces con agua estéril.
  4. Sumergir en hipoclorito sódico diluido al 20 % durante 3 min.
  5. Lavar 5 veces con agua estéril.
  6. Dejar en imbibición con hipoclorito sódico al 1 % durante 5 horas.
  7. Germinar semillas tal y como se indicó para las semillas de alfalfa

En el caso de las semillas de alfalfa que germinaron, estas fueron crecidas en tubos con medio nutritivo Rigaud y Puppo libre de nitrógeno (N), según lo descrito por Olivares y colaboradores (1980) Estos tubos se prepararon en primer lugar añadiendo un papel de filtro estéril doblado y, posteriormente, dispensando 10 mL de medio nutritivo. Se cubrieron con algodones y papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez estériles, las semillas germinadas se colocaron sobre el papel de filtro en esterilidad y con pinzas flameadas frías. Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante dos días. Tras esto, se cubrió la parte del tubo donde se desarrollan las raíces con papel de aluminio para evitar la incidencia directa de la luz y se incubaron en una cámara de cultivo de plantas durante 10 días. Se mantuvo una intensidad lumínica de 125-162  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 24/20 °C y con una humedad relativa del 70 %.

Transcurrido el tiempo de incubación, las plantas fueron inoculadas con 100  $\mu\text{L}$  del tratamiento correspondiente, vertiéndolo a lo largo de la raíz. En concreto, 24 plantas fueron inoculadas con extracto de raíz del cultivar Uslu, 24 con decantado de

suelo y 4 con el control positivo (*S. meliloti* AK21). La muestra de suelo rizosférico se preparó pesando un gramo del mismo y diluyéndolo en 5 mL de medio Rigaud y Puppott libre de N. Se agitó vigorosamente y se dejó decantar y este decantado fue usado para la inoculación. Esto mismo fue llevado a cabo con la muestra de endosfera, usando 700  $\mu$ L de extracto de raíz y 3 mL de medio nutritivo. El inóculo de control positivo se preparó a partir de un cultivo líquido del que se tomaron dos alícuotas de 1 mL. Estas se centrifugaron a 10.080 g durante 90 s. Se realizó un lavado con agua destilada estéril mediante centrifugación para eliminar los restos de N del medio y se resuspendió en 500  $\mu$ L de medio nutritivo. Las plantas de alfalfa inoculadas se cultivaron durante 26 días.

Para las semillas de guisante y habichuela, el crecimiento de las plantas se llevó a cabo mediante jarras Leonard, según lo descrito por Leonard, 1943. Con este procedimiento, se colocan macetas sobre un recipiente de vidrio que contiene solución nutritiva. Esta solución nutritiva se debe conectar de alguna manera a la maceta, en este caso, por medio de tiras de papel de filtro estériles.

En primer lugar, se preparó el sustrato a usar en las macetas, en este caso, vermiculita del número 3. Esta se lavó abundantemente en agua del grifo y, una vez escurrida, se agregó a las macetas, que fueron cubiertas con papel de aluminio para evitar su contaminación tras la esterilización. El recipiente inferior de vidrio se rellenó con un 1 L de solución Rigaud y Puppo libre de N. Estos recipientes entraban en contacto gracias a una tira de papel de filtro que se colocó en la base de la maceta y que entraba en contacto con el líquido nutritivo, que subía hasta el sustrato por capilaridad. Una vez preparado el sistema, se esterilizaron en el autoclave a 121 °C durante 20 min.

Una vez esterilizadas las jarras, se sembraban cuatro semillas germinadas de habichuela o de guisante, según fuera el caso. Como en el caso de la alfalfa, se usaron 24 semillas para cada tratamiento y planta, así como dos semillas de control positivo. Tras esto, las semillas fueron inoculadas aplicando 800  $\mu$ L del inóculo sobre las semillas. Posteriormente, se cubrieron las semillas con perlita estéril, evitando así la contaminación de las mismas y el crecimiento de hongos debido a la humedad superficial. Las jarras de vidrio fueron cubiertas de aluminio para evitar la incidencia de la luz en las raíces. Estas macetas fueron incubadas en las mismas condiciones que las

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

plantas de alfalfa, durante 40 días, rellenando debidamente con solución de Rigaud y Puppo libre de N (diluida 1:1 con agua estéril) cuando el medio era insuficiente.

Una vez se terminó el período de crecimiento de las plantas de alfalfa, guisante y habichuela, se llevó a cabo el aislamiento de bacterias endosimbiontes de los nódulos. Las plantas se extrajeron de su recipiente y se cortaron los nódulos con tijeras finas, dejando raíz a los lados para impedir que los agentes esterilizantes penetrasen en el nódulo. Estos nódulos cortados se colocaron en placas Petri con 9 mL de agua destilada. Posteriormente, se procedió a su esterilización superficial siguiendo el siguiente protocolo:

- Verter 1 mL de  $\text{HgCl}_2$  al 0,25 % (p/v), en las placas que contienen 9 mL de agua destilada, de manera que quede diluido 1:10.
- Se deja actuar durante 5 min agitando periódicamente.
- Se descarta el líquido y se lavan 6 veces con agua destilada estéril.

Tras la esterilización, se procedió al triturado de los nódulos. Usando pinzas estériles, se separaron para evitar que los extractos de unos y otros entrasen en contacto al ser machacados. Se les adicionó una gota de agua destilada estéril y con varillas de vidrio flameadas se trituraron. Para la siembra, se usaron placas con medio TY. Estas se dividieron en 8 segmentos y se sembró a partir de las varillas de vidrio que se usaron para triturar cada nódulo. Las placas se incubaron durante 2 días. A partir del crecimiento bacteriano de cada segmento, se sembró una placa individual de TY para obtener colonias aisladas y generar cultivos puros. Una vez obtenidos cultivos puros, se secuenció por un extremo el gen ribosomal *16S rRNA* para su identificación (Apartados M.5.1 y M.4.9.1).

# **CAPÍTULO I**



# **CAPÍTULO I: Micro4all: desarrollo de una librería en R y tutorial asociado para el análisis de datos de amplicones bacterianos y fúngicos.**

## **I.1. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo exponencial de las ciencias ómicas en las últimas décadas ha llevado a un cambio de paradigma en la generación y análisis de datos científicos (Fan et al., 2014; Reel et al., 2021). Las técnicas ómicas (como la metabolómica, transcriptómica, metagenómica...) permiten obtener un gran volumen de datos de manera cada vez más rápida, sencilla y económica. En este sentido, mientras que la secuenciación Sanger permite obtener sólo una secuencia por reacción, las técnicas de secuenciación masiva generan millones de secuencias en un único experimento. Estos avances han llevado a la reducción del precio de secuenciación del genoma humano a tan solo unos 1.000 USD (Goodwin et al., 2016; Kumar et al., 2019). Sin embargo, esta gran cantidad de datos requiere de un procesamiento para extraer información con sentido biológico y facilitar su interpretación. Desafortunadamente, el procesamiento de este tipo de datos resulta de gran complejidad y precisa de formación específica en campos como la informática y la estadística, siempre en colaboración con las ramas de la Ciencia involucradas en dicha investigación. No obstante, la mayoría de científicos que se dedican a la obtención de este tipo de datos carecen de los conocimientos computacionales necesarios. Así, surge un cuello de botella ante la necesidad de personal formado para el análisis de los mismos, algo que no es fácilmente alcanzable para muchos investigadores, tanto por el aspecto económico como por el tiempo disponible (Carvalho & Rustici, 2013). Esta expansión del análisis de datos a un gran número de grupos de investigación implica que, si se carece de marcos prácticos y teóricos adecuados y accesibles, se pueda reducir sustancialmente la reproducibilidad de los análisis, un aspecto básico para cualquier investigación científica. En este sentido, surgen dos necesidades fundamentales para facilitar este movimiento hacia el análisis de datos. Por un lado, crear herramientas que puedan ser utilizadas por usuarios con menor experiencia informática. Por otro lado, que estas herramientas sean integrativas, reduciendo la necesidad de utilizar diferentes

plataformas o programas, lo que facilite el análisis, reduzca el tiempo de computación y la posibilidad de cometer errores durante el proceso (Smith, 2015). De hecho, el análisis de grandes volúmenes de datos, como es el caso de análisis de datos de secuenciación masiva, requiere múltiples pasos con metodologías y problemáticas específicas, como el filtrado de las secuencias, inferencia de ASVs (del inglés, Amplicon Sequence Variant) o mapeado a bases de datos, análisis ecológicos, análisis funcionales, entre otras (Carvalho & Rustici, 2013; Smith, 2015). Para cada uno de estos pasos, existe un variado número de herramientas bioinformáticas publicadas. Esto añade una dificultad al usuario, puesto que es necesario discernir qué herramienta es la más adecuada sin tener una comprensión exhaustiva de la metodología subyacente a la misma. Por otro lado, muchas de estas herramientas trabajan con diferentes formatos de datos, lo que aumenta considerablemente el tiempo necesario de análisis. En definitiva, el desarrollo de herramientas que simplifiquen el proceso permitiría aumentar la reproducibilidad de estos análisis, no solo por la simplificación de los mismos, si no por aumentar su accesibilidad a un mayor número de usuarios altamente cualificados en áreas de conocimiento diferentes a la bioinformática.

Muchas de las herramientas que permiten la simplificación de estos procedimientos se encuadran en interfaces gráficas de usuario (GUI, del inglés, *graphic user interface*). Si bien este tipo de interfaces permiten un manejo mucho más intuitivo de la herramienta sin necesidad de tener conocimientos de programación, también presentan serias desventajas. Por un lado, el coste de este tipo de programas es muy alto, pudiendo ser inalcanzable para muchos grupos de investigación. Estos precios pueden superar los 4.000 USD para herramientas tan utilizadas como Geneious Prime (<https://www.geneious.com>). Por otro lado, suelen ser menos personalizables, reduciendo la posibilidad de adaptar los análisis a los datos de interés. Además, al utilizar una interfaz, requieren de más uso de memoria RAM y suelen ser mucho más lentos en computación y con un peor manejo de bases de datos masivas (Hakimzadeh et al., 2023; Smith, 2013). En este sentido, el uso de lenguajes de programación puede ser de gran interés para el usuario. Dentro de las diferentes opciones disponibles, R es muy popular en análisis bioinformáticos por diversas razones (Giorgi et al., 2022). En primer lugar, es una herramienta totalmente gratuita. Además, cuenta con una amplia red de soporte,

incluyendo información detallada de cada función, manuales y libros. Estos últimos pueden consultarse de manera gratuita en su versión web y cuentan con trece títulos hasta la fecha (Chollet & Allaire, 2018; Luraschi et al., 2019; Wickham, 2009, 2020; Wickham et al., 2023; Xie et al., 2019). R es un lenguaje de programación que fue diseñado específicamente para análisis estadísticos, por lo que destaca en cuanto a su potencia y versatilidad para la realización de estos análisis y para su representación gráfica (Giorgi et al., 2022; Tuimala & Kallio, 2013). Por otro lado, R permite el acceso a miles de librerías de funciones, así ante la necesidad de automatizar un análisis, es muy probable poder encontrar una función ya diseñada en cualquiera de sus repositorios. En la fecha de escritura de esta tesis, el repositorio CRAN (del inglés *Comprehensive R Archive Network*) alojaba 19.957 librerías diferentes (<https://cran.r-project.org/web/packages/>). Además, el lenguaje de programación R puede utilizarse dentro de RStudio (RStudio Team, 2020), una GUI que permite un formateado más visual del código, además de permitir la visualización de los datos obtenidos durante el procedimiento sin necesidad de tener que salir de R (por ejemplo, visualización de tablas, listas y figuras).

Hoy día los estudios de ecología microbiana pueden realizarse a gran escala y de manera muy detallada gracias al avance que ha experimentado la secuenciación masiva, propulsado por técnicas ómicas. Así, las comunidades microbianas de muy diversos hábitats pueden estudiarse mediante metagenómica o mediante metataxonomía, esta última permite obtener un gran volumen de información más rápidamente y a un coste mucho menor. Para ello, se lleva a cabo la secuenciación masiva de un marcador filogenético como el gen ribosomal *16S rRNA*. En este sentido, el estudio de las comunidades microbianas ambientales no sólo lleva asociado la secuencia nucleotídica, sino una gran variedad de información relacionada, por ejemplo, parámetros fisicoquímicos del suelo, presencia o ausencia de enfermedad en el hospedador, niveles de expresión genética, entre otros. Por tanto, los datos asociados pueden ser de muy diferente naturaleza y escala. En términos de análisis de estos datos, es necesario que la herramienta a utilizar sea capaz de almacenar esta información independientemente de su origen (McMurdie & Holmes, 2013). Por otro lado, un aspecto muy relevante es la agrupación de las secuencias, lo que tradicionalmente se ha conocido como unidades

taxonómicas operacionales (*Operational Taxonomic Units*, OTUs). Recientemente, esta definición ha comenzado a ser sustituida por la de variante de secuencia de amplicón (*Amplicon Sequence Variant*, ASV). Existen diferentes aproximaciones para obtener ASVs. Entre ellas, DADA2 aplica un algoritmo de aprendizaje automático (*machine learning*) que, a partir de la generación de un modelo de error de secuenciación específico para las muestras analizadas, infiere la secuencia a la que corresponden un grupo de lecturas (Callahan et al., 2016). Además, los datos de secuenciación de microbiomas presentan particularidades a nivel estadístico. Por un lado, se tratan de datos composicionales (las abundancias relativas de los microorganismos suman 1), lo que dificulta discernir si las diferencias en abundancias relativas son reales o se deben a la interdependencia entre sus valores. Por otro lado, son datos con una gran cantidad de valores nulos, los cuales deben ser cuidadosamente estudiados para discernir su naturaleza (verdaderos ceros, valores atípicos o falta de profundidad de secuenciación) (Lin & Peddada, 2020).

Todas estas particularidades mencionadas para el análisis de comunidades microbianas mediante secuenciación de amplicones han requerido el desarrollo de herramientas específicas. Entre estas herramientas se encuentran Phyloseq, DADA2 y ANCOM-BC, todas ellas originalmente diseñadas como librerías de R (Callahan et al., 2016; Lin & Peddada, 2020; McMurdie & Holmes, 2013). Esto, unido a la facilidad de representación gráfica y análisis estadísticos y ecológicos que llevan años incorporados a R, lleva a considerar esta herramienta como la más adecuada para el objetivo de este capítulo. Así, se propuso el desarrollo de una librería en R que incluyera funciones que simplifiquen el análisis de comunidades microbianas tanto de filtrado de calidad como a nivel estadístico. Además, se tuvo como propósito el desarrollo de un flujo de trabajo público que mostrara cómo realizar un análisis en profundidad de las comunidades microbianas en R, tratando de reducir la necesidad de trasladar los datos a herramientas externas e incluyendo herramientas reconocidas y muy utilizadas por la comunidad científica.

## I.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente capítulo de esta Tesis Doctoral se presentan los resultados correspondientes al desarrollo de una librería de funciones en R, llamada *Micro4all*, junto con un flujo de trabajo que integra tanto las funciones de este paquete como diversas herramientas para el análisis de secuencias en estudios de ecología microbiana mediante técnicas de metataxonomía (estudio taxonómico de la comunidad). Para alcanzar este objetivo, se desarrollaron una serie de funciones que se incorporaron en una librería pública, descargable desde el repositorio de GitHub. Para ello se utilizaron las herramientas proporcionadas por DevTools, además de GitHub incorporado en R para aplicar control de cambios y permitir la interacción entre usuarios. En este sentido, se siguieron las recomendaciones de los desarrolladores de R en cuanto a la producción de librerías de funciones (Marwick et al., 2018). En resumen, los pasos seguidos consistieron en la instalación del controlador de cambios (GitHub), la creación del paquete con DevTools y su vinculación con GitHub, la creación y prueba de funciones, documentación de funciones y datos de ejemplo con Roxygen, modificación de los archivos de descripción y licencia, la inclusión de paquetes externos y la creación de un README. Finalmente, se verifica el paquete con la función *check* para detectar posibles errores y se instala con *install* para comprobar su funcionamiento.

Además, se creó un flujo de trabajo donde se ejemplifica el uso de estas funciones junto con un protocolo extenso y detallado sobre el análisis de datos de microbiomas. Para crear este tutorial y poder publicarlo en línea, se utilizó el paquete *pkgdown* (incluido en DevTools). Se utilizó la función *use\_pkgdown* que crea una estructura básica para la publicación de una página web asociada al paquete. Para la redacción del tutorial, se utilizó el lenguaje Rmarkdown, de manera que se pudiera integrar texto y código en un mismo documento.

## I.3. RESULTADOS

A continuación, se expondrá el flujo de trabajo (workflow o pipeline, en inglés) a seguir con la utilización del paquete de R aquí desarrollado (*Micro4all*) y el tutorial asociado al mismo

([https://nuriaww.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriaww.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)), indicando las ventajas que el uso de este flujo de trabajo supone para agilizar este tipo de análisis de comunidades microbianas, así como los resultados que se pueden obtener al seguir los pasos indicados. Para este propósito, el tutorial se publicó con un conjunto de datos de ejemplo que permiten al usuario comprender el procesamiento que siguen los datos y el tipo de resultados que se obtienen. Estos datos de ejemplo corresponden con un subgrupo de secuencias obtenidas mediante secuenciación Illumina MiSeq de las regiones hipervariables V3-V4 del gen *16S rRNA* a partir del ADN total de muestras de endosfera de olivos de la variedad Picual. Dichos datos comprenden un total de 24 muestras, repartidas en tres localizaciones diferentes (8 muestras por localización), que fueron muestreadas y procesadas siguiendo lo expuesto en esta Tesis Doctoral en los Apartados M.2.2, M.4.2 y M.4.9.2. Dentro de estos datos de ejemplo, también se puede encontrar un objeto de R de tipo `phyloseq` que es utilizado en el tutorial para el análisis canónico de coordenadas principales (CAP), que permite el estudio de la influencia de los parámetros fisicoquímicos del suelo en la estructura de la comunidad microbiana, así como un documento con la base de datos RDP v.18 utilizado en la clasificación taxonómica, con las modificaciones introducidas por nuestro grupo de trabajo (<https://grupos.eez.csic.es/mae/>) para un mejor entendimiento de la clasificación. Por último, durante el desarrollo de este apartado, se detallará principalmente el flujo de trabajo para analizar secuencias de comunidades bacterianas, indicando las excepciones que deben tenerse en cuenta para el análisis de secuencias provenientes de hongos.

### **1.3.1. Instalación de Micro4all y lectura de archivos.**

En primer lugar, es necesario instalar el paquete `Micro4all`, que incluye numerosas funciones de utilidad para el desarrollo del análisis de datos aquí descrito. Dicho paquete se encuentra alojado en Github, por lo que es necesario utilizar el paquete `DevTools` para poder instalar paquetes provenientes de este repositorio. También será necesario cargar la librería, de manera que las funciones asociadas queden disponibles en el entorno de R. Este mismo proceso se debe llevar a cabo para las diferentes librerías de funciones utilizadas a lo largo del tutorial, como `DADA2`, `ShortRead`, `ggplot2` y `tidyverse`. Además, es necesario instalar previamente los paquetes

ANCOMBC y PairwiseAdonis utilizando el paquete BiocManager para poder instalar Micro4all de forma satisfactoria.

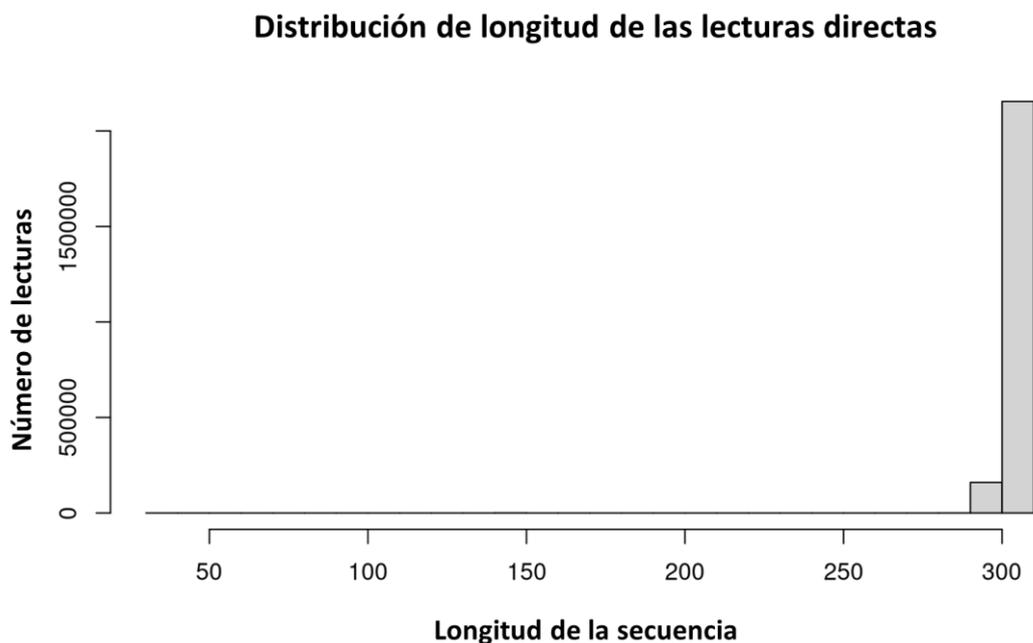
Una vez preparado el entorno, es importante almacenar la ruta a los archivos que contienen las secuencias brutas (FastQ) a analizar, de manera que esta ruta pueda ser utilizada por las diferentes funciones que requieran acceder a estos archivos. Esto se realiza fácilmente con la función *list.files*. A partir de los nombres de los archivos, se puede obtener el nombre de las muestras. Se indica también cómo modificar de manera automatizada el nombre de las muestras, sin necesidad de hacerlo manualmente. Esto se consigue gracias al uso de expresiones regulares (también conocidas como *regex*), es decir, mediante la identificación de una secuencia de caracteres que sigue una estructura o patrón repetitivo. Una vez identificados estos patrones, pueden ser sustituidos, eliminados o la cadena de caracteres puede ser dividida en función a ellos, utilizando funciones base de R, como *strsplit*. Por ejemplo, se puede dividir el nombre del archivo *L1-1\_S102\_R1\_001* según la presencia del patrón regular formado por un guion bajo (“\_”), dando como resultado 3 cadenas (L1-1, S102, R1 y 001). En este ejemplo, al quedarnos solo con la primera cadena, el nombre del archivo coincidirá con el de la muestra correspondiente a la localización 1 y réplica 1 (*L1-1*).

### **I.3.2. Evaluación de la calidad de secuenciación.**

El flujo de trabajo aquí presentado comprende varias aproximaciones para evaluar la calidad de las secuencias obtenidas, teniendo en cuenta tanto el número de secuencias obtenido, la longitud de las mismas, así como la variación del índice de calidad por base (quality score, Q). Esto es de gran utilidad ya que el análisis de la calidad de la secuenciación supone un paso crucial para el proceso de análisis de datos, permitiendo detectar rápidamente posibles problemas que deban ser solucionados antes de continuar el proceso. El número de secuencias de cada muestra se puede obtener gracias a la utilización del paquete ShortRead, que permite trabajar con archivos de diferente tipo proveniente de plataformas de secuenciación masiva (Morgan et al., 2009). Con este paquete, se consiguen procesar los archivos en R para poder manipular o acceder a su información. En este caso, trabajamos con archivos de tipo FastQ, y con

ShortRead es posible obtener el número de secuencias de cada archivo. Para automatizar este proceso, en el tutorial se realiza un bucle de tipo *for* (estructura iterativa que permite “repetir” unas líneas de código para todos los archivos indicados). Con esta información se puede evaluar si el número de secuencias de alguna muestra es demasiado bajo según lo esperado con la profundidad de secuenciación solicitada al servicio de secuenciación masiva (50.000 secuencias por muestra aproximadamente). En el caso aquí analizado, el número mínimo de secuencias obtenido por muestra fue suficientemente alto, con valor de 66.426 secuencias.

Además, también es de interés analizar la distribución de la longitud de las secuencias obtenidas. Debido a que se usó la tecnología Illumina MiSeq PE 2x300 pb, es esperable obtener una longitud cercana a los 300 pares de bases. Así, en el tutorial asociado a Micro4all, se puede encontrar el código para realizar un histograma con el número de secuencias encontradas en cada longitud. Esto se puede visualizar en un gráfico, tal y como se muestra en la Figura I.1, o a modo de tabla.

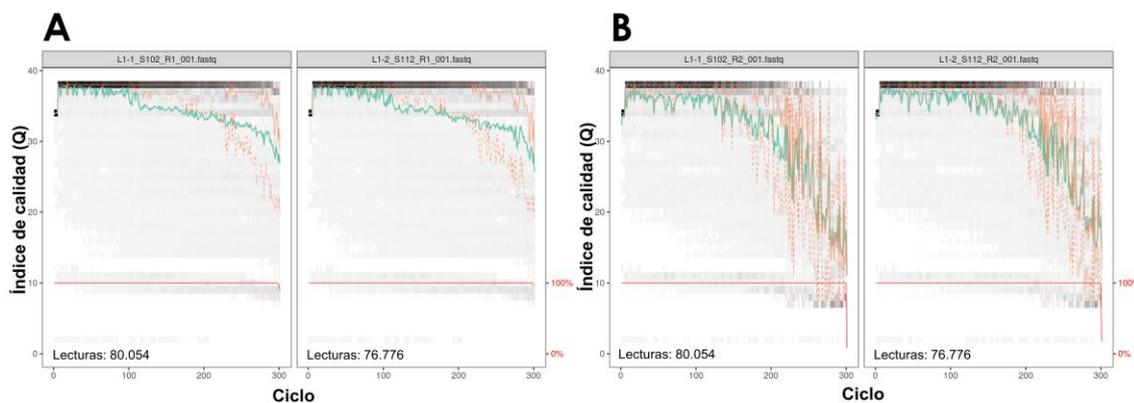


**Figura I.1.** Histograma donde se muestran el número de lecturas brutas según la longitud de las mismas. Esta representación corresponde para las lecturas directas (R1).

Otro parámetro a tener en cuenta en el análisis de calidad de la secuenciación es el índice de calidad Q (*quality score*). En los archivos de tipo FastQ, se incluye la información de este índice por cada base. El índice de calidad Q representa la probabilidad de error en la asignación de una base a una señal lumínica. Esta probabilidad es calculada durante el proceso de secuenciación teniendo en cuenta factores como la intensidad de la señal en el clúster o la relación señal-ruido, entre otras, y utilizando un sistema de calibrado con muestras cuya composición nucleotídica es conocida. Así, un Q de 20 corresponde con una probabilidad de error del 0,01, es decir, de 1 entre 100. De esta manera, una caída del Q por debajo de 20 se considera una probabilidad demasiado alta de error. En el caso de la secuenciación Illumina MiSeq, es común encontrar una caída de la calidad de secuenciación al final de la lectura, debido a un posible desfase de lectura por la acumulación de bloqueadores no eliminados durante el proceso de secuenciación. Esto se acrecienta en las lecturas reversas (R2) debido a que son secuenciadas después de las directas. La función del paquete DADA2 *plotQualityProfile* permite visualizar la evolución de este índice de calidad a lo largo de la secuencia y es incluido como método de análisis de calidad en el tutorial asociado a Micro4all. En la Figura I.2, se puede observar cómo, para los datos de ejemplo usados en el tutorial, la caída del índice de calidad solo ocurre en los últimos nucleótidos de la lectura, sin bajar por debajo de Q20 en el caso de las lecturas directas. En las reversas, el índice baja a valores inferiores a 20 en el extremo 3', por lo que esos nucleótidos deben ser eliminados.

### I.3.3. Selección de los parámetros de corte con la herramienta FIGARO.

En primer lugar, cabe destacar que esta sección solo aplica a los datos de secuenciación del gen *16S rRNA*, ya que la región secuenciada para la identificación de hongos corresponde con una región intergénica (ITS2) cuya longitud no se encuentra tan conservada. Debido a la alta variabilidad en su longitud, cualquier análisis que implique el corte de las mismas supone una potencial pérdida de información que se relacione con una variabilidad biológica real. En casos donde el estudio de la comunidad fúngica se lleve a cabo mediante secuenciación de amplicones del gen *18S rRNA* se realizarán los mismos pasos seguidos en el análisis de datos bacterianos.



**Figura I.2. Gráfico de evolución del índice de calidad de la secuencia.** Se muestra el índice de calidad (eje Y) a lo largo de la longitud de la secuencia (eje X, ciclo). En escala de grises, se muestra la frecuencia de cada índice de calidad en cada posición de la secuencia. La línea verde muestra el índice de calidad medio y las líneas naranjas muestran los cuartiles de estos índices. La línea roja muestra la proporción de lecturas que se extiende hasta dicha posición. Se muestran estos gráficos para las muestras L1-1 y L1-2, en el panel A para las lecturas directas y en el B para las reversas.

Dicho esto, uno de los primeros pasos en el análisis con la herramienta de DADA2 es el filtrado y corte de las secuencias para eliminar aquellas con menor calidad. Debido a que la elección de estos parámetros de corte (indicados dentro de la función *filterAndTrim*) se deja en manos del usuario, se decidió emplear la herramienta de FIGARO que permite automatizar este proceso, haciendo la selección basada en el

modelo de error de las secuencias. Este flujo de trabajo aporta la ventaja de incluir el código necesario para utilizar esta herramienta desde R, teniéndola previamente instalada en un entorno Linux. FIGARO devuelve una serie de parámetros de longitud para el corte de las secuencias directas y reversas, así como para el número máximo de errores esperados por secuencia, por encima del cual las secuencias son eliminadas. Para cada combinación de parámetros, indica el porcentaje de secuencias final retenidas. Por defecto, se muestra como primer resultado el más adecuado, según la puntuación asignada por FIGARO teniendo en cuenta el número y calidad de las secuencias filtradas. Con los datos de ejemplo aquí proporcionados, se seleccionó el corte de las secuencias en las posiciones 279 (lecturas directas) y 205 (lecturas reversas), así como el número máximo de errores esperados de 3 y 2 nucleótidos, en las lecturas directas y reversas, respectivamente. Para el caso de las secuencias fúngicas, no se llevó a cabo ningún corte, pero sí se aplicaron los mismos parámetros de errores esperados, así como eliminación de lecturas con bases ambiguas (N). Esto se llevó a cabo después de la eliminación de primers con la herramienta CUTADAPT (siguiente Apartado, I.3.4), ya que al no utilizarse la herramienta FIGARO, la eliminación de primers no suponía un problema para la elaboración del modelo de error de las secuencias. Si bien no se llevó a cabo un corte por longitud, sí se eliminaron aquellas secuencias que no tuvieran una longitud mínima de 50 pb, considerándose excesivamente cortas para su posterior clasificación taxonómica.

### **I.3.4. Eliminación de primers con la herramienta CUTADAPT.**

Tras el corte y filtrado de las secuencias, se eliminaron los primers utilizando la herramienta CUTADAPT. De nuevo, el flujo de trabajo de Micro4all presenta la ventaja de implementar el código necesario para el uso de esta herramienta en un entorno Linux, accediendo directamente desde R al mismo. Esto permite reducir considerablemente el tiempo de procesamiento y la intervención del usuario, reduciendo consecuentemente la posibilidad de cometer errores durante el procedimiento. La herramienta de CUTADAPT permite detectar los primers según su secuencia, lo que presenta una ventaja frente al método de eliminación de primers de DADA2 (dentro de la función *filterAndTrim*), que los elimina por longitud de secuencia.

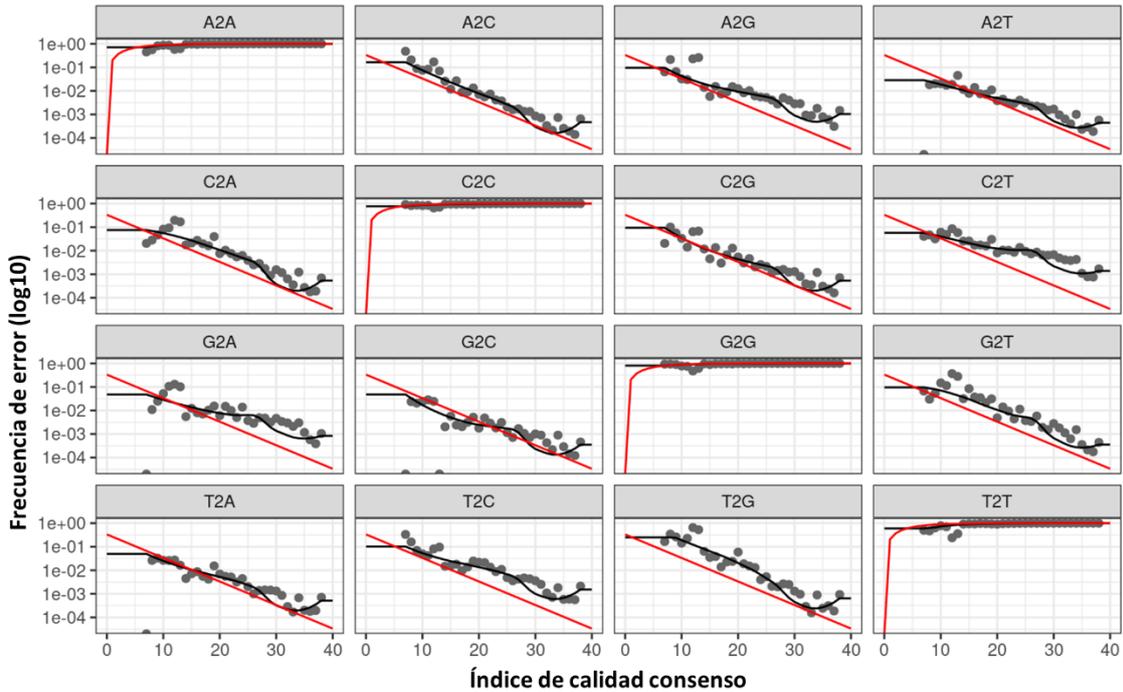
Además, presenta un gran número de argumentos que permiten personalizar el proceso, por ejemplo, pudiendo eliminar aquellas secuencias donde no se haya encontrado el primer. En el caso de este flujo de trabajo, se consideró que los argumentos a utilizar más adecuados serían los siguientes:

- `-n 2`. Argumento necesario para eliminar los primers directo y reverso.
- `--discard-untrimmed`. Argumento usado para eliminar las secuencias donde no se encontraron los primers.
- `-j 0`. Detectar el número de núcleos de computación disponibles de la Unidad Central de Procesamiento (CPU) para acelerar el procesamiento.

### I.3.5. Flujo de trabajo de DADA2.

Una vez las secuencias son filtradas según su calidad y los primers eliminados, se procede a aplicar el algoritmo de DADA2, siguiendo las indicaciones de los desarrolladores (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). Tal y como se detalló en el Apartado M.5.3, el primer paso consiste en calcular el modelo del error de secuenciación de los datos analizados (con la función *learnErrors*). En base a este modelo, se infieren las secuencias biológicamente únicas, conocidas como Amplicon Sequence Variants (ASVs, variantes de secuencia de amplicones), en cada muestra con la función *dada*, la cual se basa en el algoritmo de partición implementado por DADA2. Por último, se solapan las secuencias y se obtiene una tabla de ASVs con su conteo en cada muestra sobre la cual se eliminan las quimeras gracias a la función *removeBimeraDenovo*. Durante este procesamiento, en la generación del modelo del error, es necesario evaluar el resultado del mismo gráficamente. Esto se lleva a cabo gracias a la función *plotErrors* de DADA2 y el resultado con los datos de ejemplo se puede observar en la Figura I.3. Este gráfico muestra diversos paneles, cada uno corresponde con un posible error de secuenciación, indicado como la transición o transversión de una base a otra.

Esto le permite al algoritmo, mediante aprendizaje automático (*Machine Learning*), identificar regiones de las lecturas en las que se acumulan más sustituciones de las esperadas simplemente por la calidad de detección que consiguió el equipo en esa tanda (run) de secuenciación.



**Figura I.3. Gráfico de la frecuencia de error para cada posible transición/transversión de nucleótidos.** Cada panel muestra cada posible transición/transversión de nucleótidos, donde el primer nucleótido sería el original y el segundo nucleótido el leído erróneamente en la secuencia. El eje Y representa la frecuencia del error en escala logarítmica y el eje X el índice de calidad consenso. Los puntos representan las frecuencias de error observadas para cada muestra, la línea negra muestra la frecuencia de error estimada tras la aplicación del algoritmo de DADA2 y la línea roja muestra las frecuencias de error esperadas según la definición del índice de calidad.

Tras construir la tabla de ASVs, dentro de las indicaciones de los desarrolladores de DADA2, se propone inspeccionar la longitud de los ASVs inferidos, mostrando así mismo el número de ASVs con cada longitud. Sin embargo, en el desarrollo del flujo de trabajo de Micro4all, se consideró de interés conocer también el número de secuencias correspondiente a cada longitud, ya que un gran número de ASVs no se relaciona necesariamente con un alto número de secuencias. Por ello, se implementó el código necesario para conocer esta información, así como para representar estos valores en forma de histograma. De esta manera, se observó cómo el mayor número de secuencias se concentró en ASVs con una longitud que varió entre 402 y 428 pb en los datos de ejemplo. Por tanto, se eliminaron aquellos ASVs que no estuvieran dentro de este rango de longitud. Para los datos de la región ITS2, este tipo de filtrado debe ser evitado por la longitud variable de esta región; aunque sí habría que tenerlo en cuenta si la comunidad fúngica se analizara mediante la secuenciación de amplicones del gen *18S rRNA*.

Por último, se generó una tabla donde se registra el número de secuencias retenidas en cada uno de los pasos llevados a cabo según el protocolo de DADA2. Además, dentro de nuestro flujo de trabajo, se modificó el código para incluir una serie de columnas adicionales con el porcentaje de secuencias retenido. Esto facilita el análisis ya que permite visualizar de manera más rápida los pasos críticos del proceso que necesiten ser revisados, sin necesidad de acudir a otros programas externos o código adicional para el cálculo de los porcentajes. Así, a excepción del paso de filtrado, en ningún momento se redujo el número de secuencias retenidas en más de un 7 %, un comportamiento esperable según lo indicado por los desarrolladores de DADA2.

### **I.3.6. Clasificación taxonómica y obtención de tabla de ASVs.**

La asignación taxonómica se llevó a cabo gracias a la función integrada en DADA2 *assignTaxonomy*. Con esta función se pueden clasificar tanto secuencias bacterianas como fúngicas, utilizando las bases de datos correspondientes. En el caso de bacterias, proponemos la utilización de la base de datos RDP modificada en nuestro grupo de investigación. La modificación de esta base de datos se realizó con un script desarrollado

en nuestro grupo de investigación y consistió en incluir un fragmento del gen *18S rRNA* de olivo. Además, la clasificación de RDP deja algunos niveles taxonómicos sin clasificar. Esto ocurre en la mayoría de casos dentro del phylum *Acidobacteria*, donde, por ejemplo, géneros clasificados como *Gp1* se encuentran sin clasificar a nivel de orden y familia. Así, esto se corrigió añadiendo los niveles taxonómicos faltantes en un gran número de taxones para conseguir la clasificación en el formato correcto. Para la clasificación fúngica, se utilizó la base de datos UNITE (<https://unite.ut.ee/repository.php>).

Como ventaja adicional frente a las indicaciones de los desarrolladores de DADA2, en el flujo de trabajo asociado al paquete Micro4all, presentamos el paso de obtención de una tabla que contiene una nueva columna con los ASVs adecuadamente nombrados (numéricamente), así como la clasificación taxonómica de los mismos y sus abundancias. Esto se presenta en un formato tabla que puede ser descargado y analizado manualmente, facilitando además la transferencia directa hacia otras herramientas, como phyloseq, que permiten el análisis ecológico de los datos resultantes del procesamiento con DADA2.

### **I.3.7. Análisis de la comunidad MOCK y eliminación de secuencias de planta.**

Una de las grandes ventajas que presenta el paquete Micro4all y su flujo de trabajo asociado es la incorporación de una función que permite analizar cómoda y rápidamente los resultados de la secuenciación de una comunidad sintética (*mock community*), calculando a partir de esta información un valor de corte para eliminar aquellos ASVs que estén potencialmente mal asignados a nuestras muestras (por errores en la discriminación de los códigos de barras de Illumina). Esta función permite incluir en un único paso todas las partes necesarias para este tipo de análisis: comparación de la secuenciación con la composición real de la comunidad sintética, cálculo del porcentaje de secuencias mal asignadas, en caso de encontrar un ASV foráneo, y aplicación del valor de corte a las demás muestras, eliminando posteriormente las muestras de la comunidad sintética para que no interfieran en análisis posteriores.

Además, el diseño de la función se llevó a cabo de manera que se informe al usuario cada vez que se encuentre un ASV que no corresponda a la comunidad MOCK, indicando tanto el número de ASV, su clasificación taxonómica y su abundancia relativa en porcentaje. Ante esta información, el usuario puede decidir si utilizar ese ASV para realizar el filtrado en sus muestras o no, lo que resulta de gran utilidad en el caso de que un ASV reciba una clasificación ligeramente diferente a la establecida por la casa comercial o se quiera aplicar un valor de corte menos restrictivo. De esta manera, se proporciona al usuario una función automatizada pero flexible, que permite ahorrar tiempo sin limitar la toma de decisiones del analizador de datos. Otra ventaja asociada a esta función es la facilidad de introducir datos (tablas de ASVs u OTUs) obtenidos con otras herramientas de procesamiento de amplicones (como MOTHUR o QIIME2). Debido a que acepta una tabla de ASVs en un formato ampliamente utilizado por la comunidad científica. Además, el flujo de trabajo puede ser fácilmente detenido y retomado posteriormente en este punto si se desea, antes de continuar con el análisis ecológico de la comunidad.

En el tutorial asociado al paquete Micro4all, se presenta este análisis con una comunidad sintética adquirida comercialmente: ZymoBIOMICS *Microbial Community Standard II* (Log Distribution), ZYMO RESEARCH (<https://www.zymoresearch.com/collections/zymbiomics-microbial-community-standards/products/zymbiomics-microbial-community-standard-ii-log-distribution>).

Se secuenciaron tres réplicas de esta comunidad. Al aplicar la función, se encontró un primer ASV clasificado como *Limosilactobacillus*. Si bien la base de datos realizó esta clasificación, se concluyó que este ASV, presente en un alto porcentaje de secuencias, correspondía al *Bacillus* presente en la comunidad sintética. Por tanto, se indicó que no se quería utilizar este ASV para calcular el corte y se pasó al siguiente ASV foráneo. Este correspondía con el ASV0002 clasificado como *Streptomyces* y que suponía un 0,003881 % de las secuencias. Para la secuenciación de la región ITS2, sería necesario contar con una comunidad MOCK que contuviera varios representantes fúngicos. Si este no es el caso, pero ambas secuenciaciones se llevaron a cabo en el mismo *run*, es posible aplicar el corte calculado para bacterias a los datos fúngicos.

Para aquellos usuarios que no dispongan de una comunidad sintética, aunque se recomienda encarecidamente añadir este control de calidad en cada secuenciación, se proporciona el código necesario para realizar un filtrado según las indicaciones de Bokulich y colaboradores (2013), eliminando aquellos ASVs que supongan menos de un 0,005 % de las secuencias. Por último, se le proporcionan al usuario unas líneas de código para poder eliminar aquellos ASVs provenientes de planta, en el caso de que se analicen muestras de este tipo. Esto se presenta de manera optimizada, incluyendo todos aquellos casos que hemos podido observar durante diferentes análisis en nuestro grupo de investigación. Estos corresponden con los géneros y familias *Streptophyta*, *Chlorophyta* y *Bacillariophyta*; la familia *Mitochondria*, clase y orden *Chloroplast*, el dominio *Eukaryota* y las secuencias no clasificadas (unclassified). Además, se eliminaron los ASVs clasificados como *Cyanobacteria/Chloroplast* a nivel de phylum si no clasificaban más allá de este nivel taxonómico. Para el caso de la secuenciación fúngica, es necesario eliminar aquellos ASVs que no clasifiquen como *Fungi* a nivel de dominio.

Para una eliminación más exhaustiva de las secuencias potencialmente provenientes de planta, se incorporó en este flujo de trabajo la posibilidad de enfrentar las secuencias no clasificadas a nivel de phylum con la base de datos nucleotídica del NCBI, con el fin de analizar el porcentaje de identidad con secuencias del hospedador. Esto es especialmente útil en muestras donde la contaminación por el hospedador es muy alta, como en el caso de muestras de endosfera o de semilla. En primer lugar, es necesario obtener las secuencias en formato FASTA para generar un archivo que pueda ser enfrentado a la base de datos del NCBI. Esto se consigue gracias al paquete *seqinr*. Posteriormente, se utiliza el programa *blastn* al que se accede a través de R gracias al comando *system*, este paso requiere que el usuario instale previamente *blast+* en su equipo y que, o bien descargue la base de datos NT/NR en su equipo, lo cual acelera el proceso, o por otro lado, utilice la función de clasificación en remoto para hacer la búsqueda en la propia base de datos del NCBI de manera automatizada, aunque es un proceso mucho más lento que la primera opción.

### **I.3.8. Preparación de los datos para análisis de ecología microbiana.**

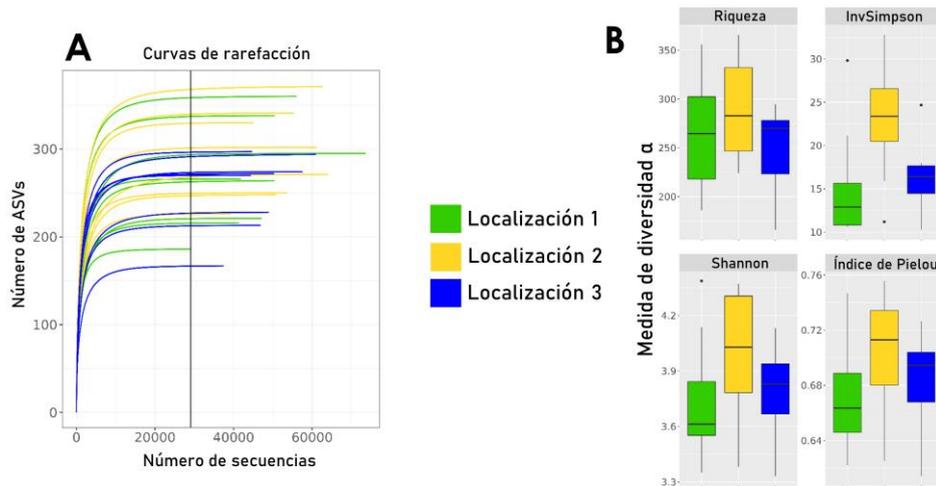
Una de las principales ventajas de este flujo de trabajo radica en la integración de múltiples herramientas ampliamente usadas en el análisis de datos de ecología microbiana. Este es el caso de *phyloseq*, una librería de R que permite incluir los diferentes tipos de datos asociados a ecología microbiana (datos de secuenciación, árboles filogenéticos, secuencias, abundancias, parámetros fisicoquímicos, entre otros) en un mismo objeto de R. Además, incluye múltiples funciones para el análisis de estos datos y su representación gráfica.

De esta manera, es primordial generar adecuadamente un objeto de tipo *phyloseq* con la información pertinente. Dentro de esta información, se incluye un árbol filogenético generado con las secuencias de los ASVs presentes en las muestras. Este árbol es de utilidad para realizar ciertos análisis ecológicos donde se quieran comparar comunidades microbianas teniendo en cuenta sus relaciones filogenéticas, como puede ser el estudio de la diversidad  $\beta$ . Para la generación de un árbol filogenético, el flujo de trabajo asociado a *Micro4all* indica cómo realizar un alineamiento con la herramienta *MAFFT* y, posteriormente, un árbol con *FastTree* sin necesidad de abandonar el entorno de R, utilizando la función *system2* para conectar con el entorno Linux. De nuevo, se facilita el procesamiento de datos al usuario, evitando el uso de diferentes plataformas. Cabe destacar que la realización de un árbol filogenético no es aconsejable para la región intergénica ITS2, ya que al ser su longitud altamente variable y no sometida a presión selectiva, no permite computar relaciones filogenéticas entre microorganismos.

### **I.3.9. Análisis de diversidad $\alpha$ .**

Estudiar la diversidad  $\alpha$  permite conocer la riqueza y diversidad microbiana de una comunidad, pero para lograr una comparación equitativa, es recomendable llevar a cabo una normalización del número de secuencias. Esto evita un sesgo que lleve, por ejemplo, a una mayor riqueza microbiana debida a una mayor profundidad de secuenciación. En este flujo de trabajo, proponemos realizar una rarefacción de los datos, según fue detallado en el Apartado M.5.5.1. Esta rarefacción consiste en normalizar todas las muestras al menor número de secuencias encontrado,

seleccionando las secuencias de manera aleatoria. En primer lugar, se realiza un gráfico de rarefacción, que permite evaluar si la normalización elegida permite que las curvas lleguen a la asíntota. Dentro de este flujo de trabajo, se detalla cómo obtener un tipo de gráfico de rarefacción más elaborado que el que se puede obtener por defecto con el paquete `vegan` y que permite añadir diferentes colores a las líneas de acuerdo a nuestro factor de interés (por ejemplo, localización). Esto es de utilidad para visualizar de manera preliminar posibles diferencias en la profundidad de secuenciación entre grupos. Para poder llevar a cabo esta representación gráfica, es necesario transformar el objeto que incluye las curvas de rarefacción a un objeto compatible con `ggplot`, una librería de R que permite una representación gráfica más personalizable. Así, cada curva de rarefacción fue almacenada dentro de una tabla (*dataframe*) para poder ser procesada con `ggplot2`. Además, se proporciona el código para hacer el gráfico, el cual es fácilmente modificable para adaptarse a los datos de cada usuario. El gráfico obtenido con los datos aquí analizados se muestra en la Figura I.4.



**Figura I.4. Gráficos de diversidad  $\alpha$ .** Panel A: se muestran las curvas de rarefacción de cada muestra y localización. El eje Y representa el número de ASVs y el eje X el número de secuencias. La línea vertical negra muestra el número de secuencias mínimo para el conjunto de datos analizado, valor en el cual se lleva a cabo la normalización. Panel B: se muestra un diagrama de cajas de los valores obtenidos para los diferentes índices de diversidad  $\alpha$ , esto es, riqueza observada, índice de la inversa de Simpson (InvSimpson), índice de Shannon, así como la equidad o índice de Pielou. En cada índice, se muestran cinco estadísticos: la mediana, dos percentiles (al 25 y al 75) y los valores máximos y mínimos. Los puntos indican valores atípicos.

La línea vertical que se observa en la Figura I.4 ocurre en la asíntota de todas las curvas, por lo que la pérdida de información por la rarefacción es mínima en este ejemplo. De esta manera, se procedió a realizar la rarefacción sobre el objeto phyloseq generado, gracias a la función *rarefy\_even\_depth* del paquete phyloseq. En este proceso, se redujo el número de secuencias a 29.122 por muestra.

En el tutorial asociado a Micro4all, se muestra cómo calcular dos índices de diversidad, uno de equidad y el de riqueza observada, así como el código detallado para llevar a cabo su representación gráfica con ggplot2, incluyendo indicaciones para adaptar este gráfico a las necesidades del usuario. El resultado obtenido con los datos de ejemplo se presenta en la Figura I.4. A partir de los valores generados para cada índice con la función *estimate\_richness*, se puede generar una tabla para ser guardada por el usuario. Esta tabla incluiría el valor de cada índice por réplica. Sin embargo, resulta de

interés poder conocer el valor medio y la desviación estándar de estos índices al agrupar las réplicas según las condiciones de estudio. Así, en el tutorial asociado a Micro4all se proporciona el código para producir esta tabla y guardarla en el terminal en formato de texto. El resultado obtenido se muestra en la Tabla I.1.

**Tabla I.1. Ejemplo de la tabla con los valores de los índices de diversidad, riqueza y equidad obtenida según lo indicado en el flujo de trabajo de Micro4all.** Se muestran los valores medios calculados para cada índice junto con la desviación estándar para cada una de las localizaciones estudiadas.

Localización	Riqueza observada	Índice de Shannon	Inversa de Simpson	Índice de Pielou
Localización 1	266,62 ± 59,74	3,74 ± 0,35	15,35 ± 6,78	0,67 ± 0,04
Localización 1	289,75 ± 51,64	3,98 ± 0,36	23,09 ± 7,13	0,7 ± 0,05
Localización 3	250,62 ± 44,89	3,77 ± 0,28	16,34 ± 4,29	0,68 ± 0,04

A partir de los índices calculados, resulta de interés llevar a cabo pruebas estadísticas que permitan conocer las diferencias en riqueza, diversidad y equidad microbianas entre las condiciones de estudio. Cada prueba estadística a realizar debe ser repetida tantas veces como índices estén bajo estudio, lo que implica reescribir código y analizar cada uno de los resultados por separado. En este sentido, Micro4all presenta una gran ventaja para el usuario ya que permite realizar cada una de estas pruebas de manera simultánea para todos los índices a analizar, simplemente indicando el número de índices que se quieren estudiar dentro de la tabla de diversidad  $\alpha$  generada anteriormente. Dentro de este grupo de funciones se incluye la posibilidad de realizar pruebas de homocedasticidad (prueba de Levene, función *levene.test.alpha*), de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk, función *Shapiro*), análisis de varianza (ANOVA, funciones *BalancedAnova* y *UnbalancedAnova*), método no paramétrico de diferencias entre medias (prueba de Kruskal-Wallis, función *Kruskal.Wallis*), así como pruebas *post-hoc* para determinar las diferencias dos a dos (pruebas de Dunn, Tukey y Wilcoxon, cuyas funciones en Micro4all equivalen con *dunnT*, *tukey.test* y *Wilcoxon.test*).

Los resultados obtenidos con los datos de ejemplo se resumen en la Tabla I.2, incluyendo los valores de  $p$  de cada una de las pruebas estadísticas realizadas. En el caso de los datos analizados en el tutorial, estos siguieron una distribución normal y mostraron homocedasticidad (valor de  $p > 0,05$ , según una prueba de Shapiro; valor de  $p > 0,05$ , según una prueba de Levene). En base a estos resultados, se aplicó un ANOVA balanceado para analizar las diferencias de las medias entre los grupos del factor localización, para cada índice de diversidad. El único índice con diferencias estadísticamente significativas fue la inversa de Simpson ( $P = 0,04$ ). El test *post hoc* aplicado (test de bondad de ajuste de Tukey) mostró que ninguna de las comparaciones dos a dos en este índice fueron estadísticamente significativas al ajustar el valor de  $p$  según el método de Benjamini-Hochberg (valor de  $p > 0,05$ ) (Tabla I.2.).

**Tabla I.2. Valores de  $p$  de las diferentes pruebas estadísticas realizadas sobre los índices de diversidad  $\alpha$  comparados entre las diferentes localizaciones analizadas en el tutorial del paquete Micro4all. L1: localización 1, L2: localización 2, L3: localización 3.**

Valores de $p$	Riqueza observada	Índice de Shannon	Inversa de Simpson	Índice de Pielou
Test de Levene	0,62	0,79	0,61	0,68
Test de Shapiro-Wilks	0,55	0,81	0,42	0,93
ANOVA	0,34	0,31	0,04	0,33
Test de Tukey	-	-	0,05 (L1-L2) 0,94 (L1-L3) 0,10 (L2-L3)	-

### I.3.10. Análisis de diversidad $\beta$ .

El análisis de la diversidad  $\beta$  permite estudiar de manera comparativa las comunidades microbianas bajo diferentes condiciones de estudio. De la misma manera que ocurría con la diversidad  $\alpha$ , es necesario llevar a cabo una normalización de los datos. Sin embargo, para este tipo de análisis se recomienda evitar la rarefacción porque introduce más sesgos de los que evita (McMurdie & Holmes, 2014). En este caso, la

normalización llevada a cabo se realiza con la librería edgeR, que permite tener en cuenta el diferente tamaño de librería y la composicionalidad de los datos (ver Apartado M.5.5.2). Una vez realizada la normalización, se pueden utilizar diferentes métodos para calcular las distancias o disimilitudes entre poblaciones, entre los cuales se encuentran Bray-Curtis (tiene en cuenta la variación en la abundancia relativa de los miembros de la comunidad), Weighted Unifrac (se calcula en base a las abundancias relativas y la distancia filogenética entre los miembros de la comunidad) y Unweighted UniFrac (solo tiene en cuenta las distancias filogenéticas entre los miembros de la comunidad). En primer lugar, se computan las distancias o disimilitudes para después utilizar una prueba estadística que permita evaluar la hipótesis de si existen o no diferencias en la distribución de los miembros de la comunidad entre grupos. Gracias a la implementación de la función *Permanova* en Micro4all, el cálculo de la distancia o disimilitud y la prueba estadística se pueden realizar de manera simultánea en un único paso, simplificando código y ahorrando tiempo al usuario. Además, la función *Permanova* permite incluir en sus argumentos varios métodos de distancia, por lo que con una única ejecución se pueden obtener los resultados de varios métodos para ser comparados. Además, esta función también permite realizar una prueba de dos vías (es decir, incluyendo más de un factor en la fórmula del modelo). Para interpretar adecuadamente los resultados de una prueba de PERMANOVA, siempre es necesario llevar a cabo una prueba de dispersión beta. Si existen diferencias significativas en la dispersión de los datos, es posible que un resultado significativo en PERMANOVA no suponga una estructuración diferencial de las comunidades (evaluada como la diferencia en sus centroides). De esta forma, en Micro4all se incorpora una función llamada *Betadispersion* que, como ocurría con *Permanova*, permite integrar todos los pasos necesarios para este tipo de análisis en una única función (prueba de *betadisper* y permutación de los datos con *permutest*), incluyendo el cálculo simultáneo con varias medidas de distancia. Los resultados de ambas pruebas aplicando estas funciones en los datos de ejemplo se muestran en la Tabla I.3.

**Tabla I.3. Se muestran los resultados del análisis de diversidad  $\beta$  entre las diferentes localizaciones analizadas en el tutorial del paquete Micro4all.** Estos análisis incluyen un PERMANOVA (se indican los valores de  $p$  de dicho test y el valor del  $R^2$ ) así como un test de dispersión beta. En negrita y cursiva se indican los valores de  $p$  estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ).

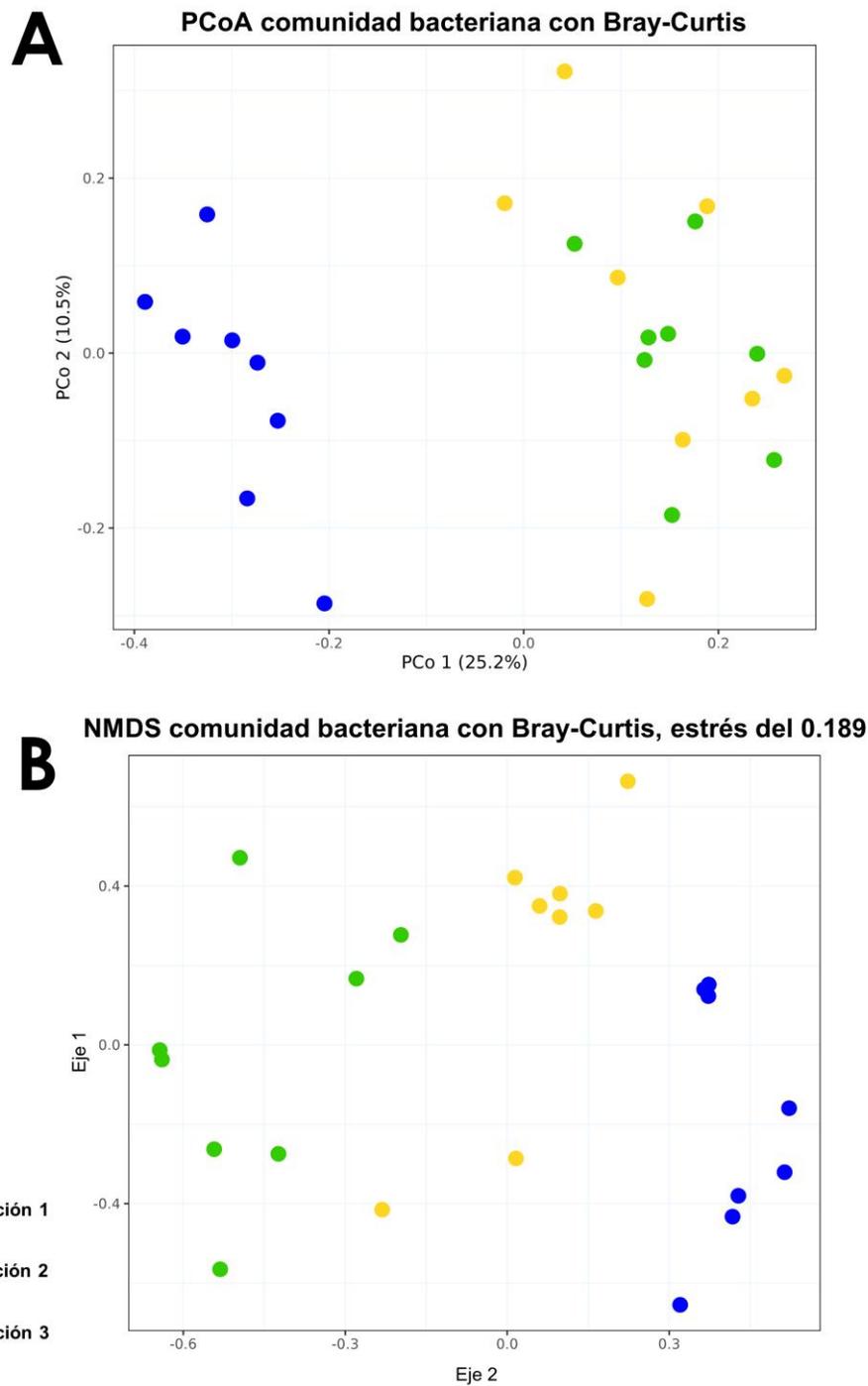
PERMANOVA							BETADISPERSION		
Bray-Curtis			Weighted UniFrac		UniFrac		Bray-Curtis	Weighted UniFrac	UniFrac
valor de $p$	$R^2$	<i>Post hoc</i>	valor de $p$	$R^2$	valor de $p$	$R^2$	valor de $p$		
<b>0,001</b>	0,30	<b>0,005</b> (L1-L2) <b>0,0015</b> (L1-L3) <b>0,0015</b> (L2-L3)	<b>0,02</b>	0,16	<b>0,005</b>	0,21	0,48	0,61	0,46

Por último, cuando se trabaja con más de dos condiciones de estudio (conocido como los niveles de un factor en estadística), como es el caso aquí presentado (tres localizaciones), resulta importante a la hora de interpretar los resultados conocer qué pares de grupos presentan diferencias estadísticamente significativas. Para ello, se lleva a cabo un test *post-hoc*, en este caso, un *pairwise adonis*. En Micro4all, se incorpora una función que permite realizar esta prueba estadística con varias distancias de manera simultánea (*PairwiseAdonisFun*). Es importante resaltar que esta prueba es útil solo si se tienen más de 3 réplicas por tratamiento/condición. En caso contrario, siempre se obtendrían valores sin significación estadística.

Tal y como se puede observar en la Tabla I.3, la prueba de PERMANOVA realizada devolvió diferencias estadísticamente significativas para las tres métricas usadas (Bray-Curtis, Weighted UniFrac y UniFrac, valor de  $p < 0,05$ ). Es decir, según estas métricas, las comunidades microbianas de las diferentes localizaciones mostraban una estructuración diferencial, teniendo en cuenta que la prueba de dispersión beta devolvió una ausencia de significación para las tres métricas empleadas. Además, la prueba de PairwiseAdonis devolvió diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de muestras. Observando los resultados, el método de cálculo de

disimilitudes de Bray-Curtis devolvió un valor de  $R^2$  mayor a las demás métricas, por lo que explicaba un mayor porcentaje de la varianza.

A la hora de interpretar los análisis de diversidad  $\beta$ , resulta de gran utilidad la visualización de la distribución de las muestras mediante métodos de ordenación, lo que permite evaluar comportamientos anómalos, la formación de subgrupos y la separación entre las comunidades de los grupos estudiados. La ventaja del tutorial asociado a Micro4all en este apartado es proporcionar, en pocas líneas de código, la posibilidad de realizar varios gráficos de ordenación con diferentes métricas de distancia de manera simultánea. Estos gráficos corresponden con un PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) y un NMDS (*Non-metric multidimensional scaling*), cada uno de los cuales generado por triplicado, con las tres métricas usadas en análisis anteriores (Bray-Curtis, Weighted UniFrac y Unweighted UniFrac). Gracias al código proporcionado, estos gráficos se almacenan en una variable llamada *plot\_list*, que consiste en una lista donde cada elemento corresponde con un gráfico. Acceder a cada uno de ellos para su visualización en R y almacenado en el terminal resulta sencillo, indicando el elemento de la lista al que se quiera acceder, por ejemplo, *plot\_list[1]* que corresponde con un PCoA realizado con medidas de disimilitud mediante el método de Bray-Curtis. En la Figura I.5 se muestran dos de los gráficos obtenidos, en concreto, un PCoA y un NMDS con disimilitudes Bray-Curtis. Se puede observar una separación clara entre las tres localizaciones donde fueron obtenidos los datos.



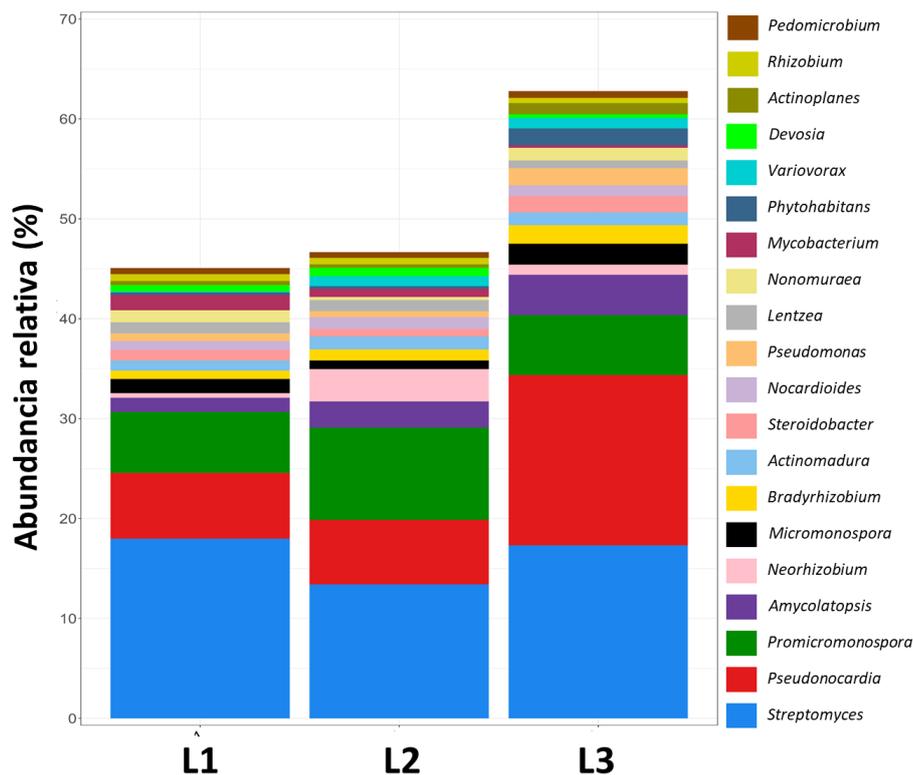
**Figura I.5. Gráficos de diversidad  $\beta$ .** Panel A: Representación gráfica en 2D de la distancia entre muestras calculada como disimilitud de Bray-Curtis presentada mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA), indicando en cada eje el porcentaje de varianza explicada. Panel B: Representación gráfica en 2D de la distancia entre muestras calculada como disimilitud de Bray-Curtis presentada mediante un Análisis no Paramétrico de Escalamiento Multidimensional (NMDS), mostrando el valor de estrés generado.

### **I.3.11. Generación de tablas con abundancia relativa y representación gráfica del perfil taxonómico.**

El perfil taxonómico de una comunidad microbiana aporta información crucial para entender la ecología de la misma, ya que permite inferir el papel que desempeñan los individuos en la estructuración de la comunidad, así como la identificación de posibles funciones beneficiosas o perjudiciales para el hospedador. El abordaje de este análisis se suele llevar a cabo mediante la representación gráfica del perfil taxonómico a diferentes niveles de clasificación, como a nivel de género y/o de phylum. Esto se puede llevar a cabo tanto en R como con herramientas externas. Así, en el tutorial asociado a Micro4all, se indica pormenorizadamente cómo obtener tablas de abundancia relativa tanto a nivel de ASV como a nivel de género y/o phylum. Estas tablas se pueden obtener tanto por muestra como agrupando las mismas según las condiciones de estudio, en cuyo caso se computa tanto la media como la desviación estándar de la misma. De esta forma, el usuario puede obtener unas tablas fácilmente manipulables e interpretables con programas ampliamente usados como MS Excel (en caso de que se quiera analizar manualmente), además de poder ser utilizadas para la representación gráfica con otro tipo de herramientas externas a R. Para producir estas tablas, se parte del objeto `phyloseq` sin normalizar y se emplean una serie de funciones para generar la media por grupo y la desviación estándar (*aggregate*), así como para unir esta información en una misma tabla (*merge*). En estos pasos se añaden unas líneas de código para comprobar que el proceso haya ocurrido de manera apropiada, evaluando si la suma de las abundancias relativas por muestra o grupo suma 100. Por otra parte, se indican los argumentos que deben ser cambiados por el usuario para adaptar el código al caso de estudio concreto (por ejemplo, cambiando la agrupación de las muestras o el número de las columnas donde se localizan las mismas en la tabla de ASVs).

La generación de un gráfico de barras apiladas con la abundancia relativa de los principales géneros se muestra detalladamente en el flujo de trabajo asociado a Micro4all. Para simplificar el procesamiento al usuario, no sólo se muestra el código del gráfico, si no también todo el proceso de preparación de los datos, indicando paso a

paso cómo adaptar este código en caso de que no se quiera filtrar el número de taxones (proponemos representar los 20 más abundantes para facilitar la interpretación del gráfico) o se quiera representar otro nivel taxonómico (phylum). Por otra parte, en este apartado se integra la información necesaria para generar una leyenda adecuadamente formateada (con los nombres de los taxones en cursiva). La inclusión de este tipo de modificaciones en la leyenda no es sencilla con herramientas como ggplot, por lo que resulta muy útil integrar este código, de manera que se reduzca la necesidad de modificar el gráfico generado con herramientas externas a R. Por otra parte, también se proporciona la posibilidad de generar y modificar una paleta de colores aleatoria, fijando el número de taxones a representar, lo que es especialmente útil cuando el número de taxones es elevado. En la Figura I.6, se muestra el resultado de dicha representación gráfica, mostrándose los 20 géneros más abundantes. Como se comentaba al principio de esta sección, este análisis permite al usuario identificar los géneros más abundantes, en este caso, *Streptomyces* y *Pseudonocardia*, abriendo la puerta a la interpretación de su papel en la comunidad microbiana.



**Figura I.6. Perfil bacteriano a nivel de género.** Se muestran los perfiles de composición bacteriana a nivel de género de las diferentes localizaciones estudiadas (L1: localización 1; L2: localización 2; L3: localización 3). Su abundancia se expresa en porcentaje como abundancia relativa media de las réplicas de cada localización.

### I.3.12. Análisis de abundancia diferencial de taxones con ANCOM-BC.

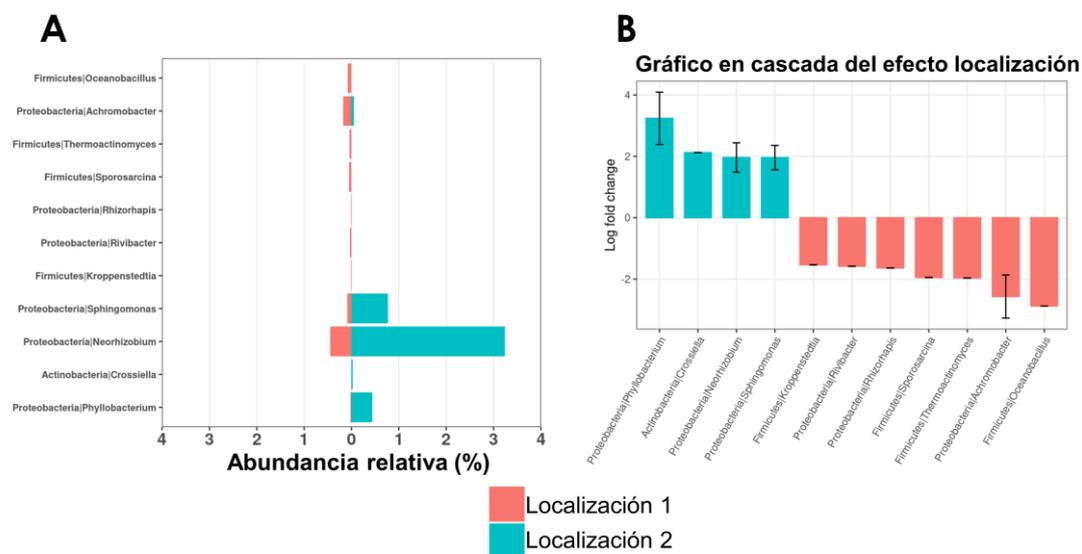
Una vez conocida la composición taxonómica de la comunidad microbiana (véase apartado anterior), resulta de interés abordar qué taxones se encuentran diferencialmente enriquecidos bajo las diversas condiciones de estudio. La principal problemática en este sentido cuando nos referimos a análisis de amplicones es la composicionalidad de los datos (las abundancias suman 1, por lo que la disminución de un taxón no implica necesariamente un cambio en su abundancia absoluta, sino un cambio en la proporción de los individuos secuenciados), así como la presencia de muchos ceros (*sparse data*). Por ello, en el flujo de trabajo asociado a Micro4all se

incorpora una herramienta específicamente diseñada para el análisis de este tipo de datos, ANCOM-BC (para más detalle, véase el Apartado M.5.5.4). La ventaja que presenta Micro4all respecto al uso de ANCOM-BC radica en la posibilidad de realizar múltiples comparaciones entre grupos. La función implementada en la librería original, *ancombc*, sólo permite la comparación entre el primer grupo con todos los demás. Esto implica que el usuario deba realizar cambios sobre el objeto *phyloseq* que se aporta a *ancombc* cada vez que quiera realizar otro grupo de comparaciones. Para evitar estas tareas, que suponen mucho tiempo de manipulación cuando evaluamos un factor con más de dos niveles/grupos, se desarrolló la función *ancomloop* dentro de Micro4all, la cual utiliza la función de *ancombc* de manera iterativa, donde en cada repetición se reordenan los grupos de muestras, de manera que en el objeto *phyloseq* aparezca primero el grupo que se desea comparar frente a los demás. Esto se consigue gracias al uso de factores. El resultado de la función es una lista que incluye varios elementos, cada uno de los cuales es una tabla con las diferentes comparaciones. Además, también se proporciona el código necesario para poder filtrar estas tablas, en caso de que se quieran obtener solo aquellas con resultados estadísticamente significativos o con ciertos valores de *Log Fold Change*, es decir, el número de veces que aumenta o disminuye la proporción de un determinado género entre las distintas muestras comparadas en escala logarítmica (en este caso, con logaritmos natural).

Otra de las ventajas del tutorial asociado a Micro4all en este apartado radica en la representación gráfica de los resultados. Se proporcionan de manera detallada las instrucciones para obtener dos tipos de gráficos que consideramos complementarios para la interpretación de los resultados de ANCOM-BC, esto es, un gráfico en cascada y un gráfico piramidal. El gráfico en cascada representa los valores de *Log Fold Change* entre localizaciones de los taxones con diferencias estadísticamente significativas y un *Log Fold Change* mayor al rango establecido por el usuario. Por su parte, el gráfico piramidal puede ser un complemento muy interesante, ya que se genera para los mismos taxones representados en el gráfico de cascada pero basado en su abundancia relativa en lugar de en el diferencial de cambio en escala logarítmica (*Log Fold Change*). Esto permite una interpretación más intuitiva de los resultados de ANCOM-BC en términos de abundancia en la comunidad. Además, permite identificar discrepancias

entre ambos análisis, ya que ANCOM-BC realiza una transformación de las abundancias relativas en función a las características de los datos (tamaño de la librería y presencia de ceros, entre otras).

En la Figura I.7, se muestran los gráficos obtenidos con el conjunto de datos de ejemplo. En este caso, se filtraron aquellos géneros que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las localizaciones 1 y 2. Dentro de estos, se seleccionaron aquellos que tuvieron más del cuádruple de abundancia en alguna de las dos localizaciones, es decir, un *Log Fold Change* mayor a 1,5 o menor a -1,5.



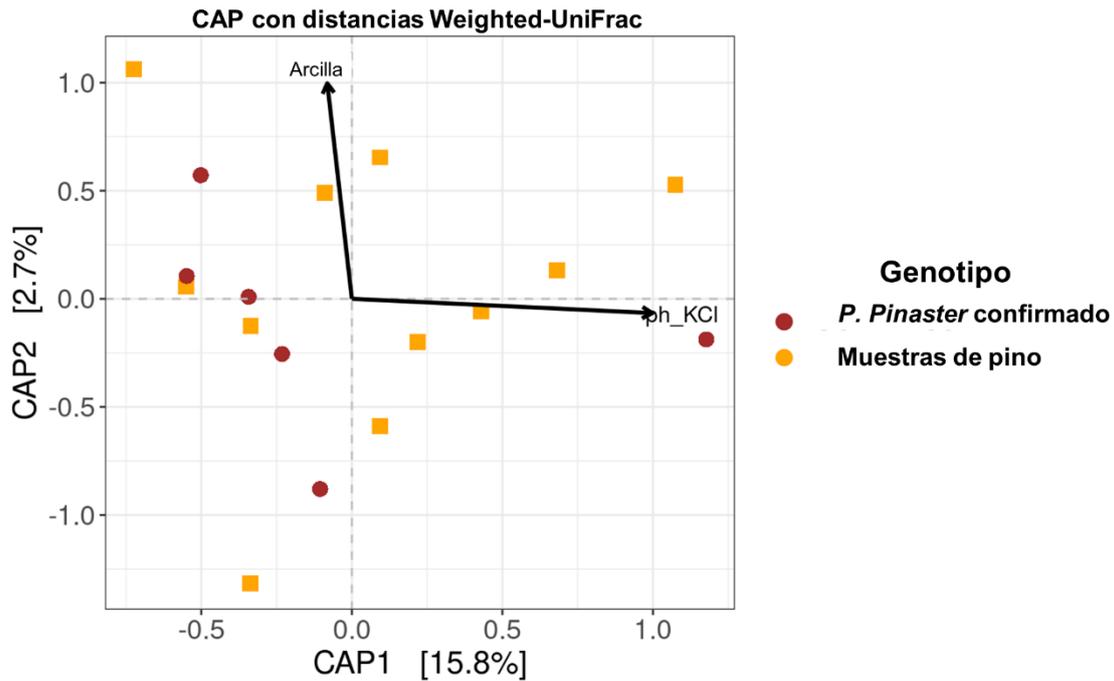
**Figura I.7. Gráficos de abundancias diferenciales entre taxones.** Se muestran aquellos géneros bacterianos con diferencias estadísticamente significativas según ANCOM-BC (valor de  $p < 0,05$ ) y que presentaron un *Log Fold Change*  $\geq 1,5$  o  $\leq -1,5$  al comparar las localizaciones 1 y 2, en dos tipos de gráficos diferentes. Panel A: gráfico piramidal donde se muestra la abundancia relativa de los géneros. Panel B: gráfico en cascada donde se muestra el *Log Fold Change* de dichos géneros.

### I.3.13. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP).

Los análisis de comunidades microbianas ambientales suelen acompañarse de estudios de variables a las que están expuestas estas comunidades. En el caso del estudio de la diversidad microbiana de suelo o de raíz, se pueden determinar diferentes parámetros físicoquímicos del suelo. Para poder abordar la posible influencia de estos

parámetros en la comunidad microbiana, sería necesario estudiar cómo la variación en estos parámetros resulta explicativa de los cambios observados en las comunidades microbianas en términos de diversidad  $\beta$ . En este sentido, el análisis CAP permite hacer un gráfico de ordenación con un modelo previamente generado de la influencia de las variables explicativas, mostrando la varianza explicada por estas y la dirección de su variación. En el flujo de trabajo aquí presentado, mostramos los pasos necesarios para realizar este tipo de análisis cuando el número de parámetros fisicoquímicos es alto y resulta necesario seleccionar los parámetros independientes entre sí de manera objetiva. Para poder determinar qué parámetros están ejerciendo una influencia en la comunidad, se utiliza la función *ordistep* de la librería *vegan*. Con esta función, se genera un modelo de manera aditiva. En cada paso, se agrega una nueva variable (en este caso, parámetros fisicoquímicos) y se evalúa si añade información o no a la varianza explicada por dicho modelo. Además, nuestro flujo de trabajo también incorpora la generación del gráfico de ordenación.

En esta parte del tutorial, se utilizaron una serie de datos diferentes a los empleados en apartados anteriores, si bien se encuentran disponibles en el mismo enlace de descarga. Estos datos corresponden con muestras de endosfera de varias especies del género *Pinus*, previamente muestreadas en nuestro grupo de investigación. El resultado de aplicar este tipo de análisis se puede ver en la Figura I.8. Como se puede observar, las muestras de *Pinus pinaster* se asociaban con suelos más ácidos (menor pH). En esta figura también se muestra la arcilla para ejemplificar cómo se visualizaría un gráfico de este tipo con más de una variable.



**Figura I.8. Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP) sobre muestras de endosfera de *Pinus pinaster*.** Se muestra un gráfico de ordenación de la comunidad bacteriana secuenciada para muestras de endosfera de *P. pinaster* cuya especie fue confirmada por genotipado y de muestras de pino donde la especie *P. pinaster* no pudo ser confirmada. Los ejes muestran el porcentaje de varianza explicado y las flechas la dirección de cambio de los parámetros fisicoquímicos del suelo, siendo estos la arcilla (clay) y el pH (en este ejemplo, sólo el pH ejerció una influencia estadísticamente significativa en la comunidad).

### I.3. DISCUSIÓN

Con el avance de la secuenciación masiva, las técnicas de *metabarcoding*, y particularmente las de metataxonomía, han ganado una gran popularidad en los estudios de ecología microbiana. Estas técnicas permiten la identificación simultánea de especies microbianas en una muestra de ADN ambiental, logrando así un estudio más pormenorizado de la ecología microbiana en múltiples ecosistemas (Creer et al., 2016; Hakimzadeh et al., 2023). Ante la generación de grandes volúmenes de datos, se produce un cuello de botella en el análisis de los mismos, tanto por las dificultades técnicas como por la amplia variedad de herramientas disponibles. De hecho, según Hakimzadeh y colaboradores (2023), existen más de 32 herramientas bioinformáticas

robustas para el análisis de datos de ecología microbiana. De esta manera, el flujo de trabajo aquí presentado pretende aunar las herramientas más utilizadas en los estudios de metataxonomía mediante *metabarcoding*, permitiéndole al usuario realizar un análisis profundo de sus datos sin necesidad de exportarlos fuera de R.

Ante la variedad de plataformas y programas disponibles, se han llevado a cabo numerosos análisis comparativos con el objetivo de proporcionar a la comunidad científica directrices objetivas en la elección de estas herramientas. Sin embargo, no se ha llegado a un consenso en este sentido. Straub y colaboradores (2020) compararon los resultados obtenidos al procesar tres comunidades sintéticas (*mock*) con características diferentes (calidad de la secuenciación, número de especies, equidad...) utilizando Mothur, QIIME1, QIIME2 (con la extensión de DADA2 y Deblur) y MEGAN (Estaki et al., 2020; Huson et al., 2007; Schloss et al., 2009; Straub et al., 2020). Determinaron que la mejor herramienta fue QIIME2 en términos de menor número de falsos positivos y mejor asignación taxonómica de los miembros de la comunidad. Sin embargo, Prodan y colaboradores (2020) analizaron una muestra de una comunidad *mock* con tres herramientas basadas en ASVs (DADA2, QIIME2 deblur, y USEARCH-UNOISE3). En este sentido, DADA2 mostró la mayor sensibilidad (mayor detección de diferentes taxones), aunque con una menor especificidad (es decir, detecta más falsos positivos) en comparación a las otras dos herramientas. Por otro lado, Özkurt y colaboradores (2022) mostraron que la herramienta Lotus2 fue más precisa que QIIME2, DADA2 y PipeCraft2 a la hora de describir la composición taxonómica de la comunidad *mock*. Así, la variabilidad encontrada en estos estudios puede deberse a los diferentes conjuntos de datos utilizados, lo que remarca la necesidad de ajustar los parámetros de manera adecuada según las características de los datos a analizar (Hakimzadeh et al., 2023). A esto se suma que cada estudio evalúa una combinación diferente de herramientas, lo que hace complejo poder extraer una conclusión objetiva frente a los métodos disponibles. Por ello, en el presente texto no se pretende proporcionar una discusión detallada sobre las diferencias en robustez o sensibilidad del flujo de trabajo de Micro4all. Este objetivo sería de una complejidad que queda fuera de los objetivos de esta Tesis Doctoral, por lo que se comparará esta herramienta con aquellas más

utilizadas por la comunidad científica en términos de facilidad de uso e integración de diferentes algoritmos.

Dentro de los programas o flujos de trabajo más utilizados en la comunidad científica, destacan aquellos que integran múltiples algoritmos y que pueden ser personalizados por el usuario, como DADA2, QIIME2 y Mothur (Callahan et al., 2016; Estaki et al., 2020; Hakimzadeh et al., 2023; Schloss et al., 2009). En este sentido, DADA2, implementado como librería dentro de R, incluye funciones para diferentes pasos del análisis de datos. Su principal utilidad es la capacidad de producir variantes de secuencias de amplicones (ASVs) con un algoritmo basado en aprendizaje automático. Además, también incluye funciones para el filtrado de calidad, eliminación de primers, eliminación de quimeras y clasificación taxonómica. Aunque en su tutorial en línea se presentan instrucciones para realizar el análisis ecológico de la comunidad una vez obtenida la tabla de ASVs, estas se encuentran limitadas a la obtención de dos tipos de gráficos de diversidad (<https://benjineb.github.io/dada2/tutorial.html>). En este sentido, el flujo de trabajo de Micro4all, además de integrar DADA2, incluye los pasos necesarios para utilizar paquetes como Phyloseq, Vegan y ANCOM-BC sin requerir al usuario la elaboración de un código propio ni migrar a otra plataforma o software, permitiendo la realización en profundidad de análisis de diversidad  $\alpha$  y  $\beta$ , así como la elaboración de perfiles taxonómicos y de análisis de abundancias diferenciales.

En cuanto a QIIME2, es una herramienta específicamente diseñada para el análisis de ecología microbiana e incluye extensiones que permiten integrar otras herramientas. Sin embargo, no presenta la ventaja de ser tan personalizable como R. Esto se refleja especialmente en la generación de gráficos, donde R sobrepasa en posibilidades a QIIME2 gracias a la librería ggplot2 (Wickham, 2009). Si bien QIIME2 es más fácilmente manejable por usuarios con un menor conocimiento de bioinformática (Hakimzadeh et al., 2023; Marizzoni et al., 2020), nosotros solventamos esta problemática proporcionando un código sencillo y muy detalladamente explicado en nuestro flujo de trabajo en línea. Por otro lado, algunas de las herramientas específicas para datos de ecología microbiana son desarrolladas originalmente en R, como es el caso de ANCOM-BC o DADA2, por lo que un usuario de QIIME2 necesita esperar a su implementación en formato de extensión (Callahan et al., 2016; Lin & Peddada, 2020).

Las problemáticas en cuanto a representación gráfica e implementación de herramientas desarrolladas en R se aplican de igual manera a Mothur. De hecho, sus desarrolladores han publicado recientemente una revisión sobre la evolución de Mothur en los últimos diez años donde afirman que desearían haber desarrollado Mothur como paquete de R (Schloss & Mcbain, 2020).

Otras herramientas ampliamente utilizadas por la comunidad científica, sobre todo por aquellos que buscan el uso de interfaces de usuario sin necesidad de tener conocimientos de programación, son MicrobiomeAnalyst y EZBioCloud (Chong et al., 2020; Yoon et al., 2017). Estas herramientas presentan una mayor facilidad de uso que otras de las discutidas anteriormente, como QIIME2, ya que se tratan de plataformas web, que no requieren de la instalación de ningún programa ni un sistema operativo concreto por parte del usuario. Si bien esto aporta sencillez de uso, agrava el problema de la falta de personalización de los análisis. En este sentido, MicrobiomeAnalyst carece de ciertas herramientas de interés para el estudio de datos de ecología microbiana, tales como FIGARO (para la selección de los parámetros de filtrado para DADA2) o ANCOM-BC. Por otro lado, la generación de gráficos es muy limitada, no pudiendo personalizarse los colores utilizados, entre otras características gráficas. Esto contrasta con la potencia gráfica de R gracias al uso de la librería ggplot2 (Wickham, 2009). La problemática es similar para EZBioCloud, que carece de métodos de ordenación gráfica tan utilizados como el NMDS, a lo que se añade que se trata de una plataforma de pago.

En conclusión, el flujo de trabajo asociado a Micro4all representa diversas ventajas para el análisis de datos en estudios de ecología microbiana mediante *metabarcoding*, permitiendo la implementación de múltiples herramientas muy utilizadas por la comunidad científica a través de un lenguaje de programación, con una aproximación explicativa y detallada, aunando sencillez y personalización del código. Como perspectivas futuras, sería interesante la incorporación de más análisis como puede ser la obtención de redes de coocurrencia microbiana o análisis de inferencia funcional como los realizados con FAPROTAX y FungalTraits (Louca et al., 2016; Pölme et al., 2020). Además, también sería de interés poder incorporar este código en una aplicación web desarrollada a partir de R con el sistema *Shiny apps* a través de la librería

Shiny. Esto permitiría el acceso a usuarios sin ningún conocimiento en programación, como primera aproximación al uso de este flujo de trabajo (Wickham, 2021).



## **CAPÍTULO II**



## CAPÍTULO II: Estudio comparativo de comunidades microbianas de encina y olivo sometidas a diferentes manejos del suelo.

### II.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivo (*Olea europaea L. subsp. europaea var. europaea*) constituye un agroecosistema de gran importancia para los países de la Cuenca Mediterránea, donde ha formado parte de su historia y cultura durante siglos (Uylaşer & Yildiz, 2014). En España, primer productor mundial de aceite de oliva y aceituna de mesa, este cultivo leñoso tiene una relevancia social, económica y agroecológica indiscutible. De hecho, en España se concentra casi el 25 % del total de olivos cultivados en el mundo y produce el 40 % del aceite de oliva mundial (<http://www.internationaloliveoil.org/>). En Andalucía, con el 62 % de la superficie olivarera española y el 30 % de la europea (<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/>), el impacto de la constante expansión de este cultivo leñoso sobre los bosques mediterráneos autóctonos ha sido significativo. Las áreas originalmente cubiertas por encinares en esta región han disminuido drásticamente en los últimos siglos debido, entre otras razones, al continuo aumento de las tierras dedicadas al cultivo del olivo, y también debido a las características del agroecosistema del encinar (*Quercus ilex L. subsp. ballota*) implantado en algunas regiones de la Península Ibérica: las llamadas dehesas (Pulido et al., 2001).

En la mayoría de los olivares se suelen emplear técnicas como el laboreo, desbroce y aplicación de productos fitosanitarios. Estas prácticas agrícolas provocan una disminución de la biodiversidad que también se refleja en las comunidades microbianas asociadas a estas plantas leñosas (Bevivino et al., 2014; Gabel et al., 2016; Y. Liang et al., 2015). En este sentido, el uso de pesticidas afecta a la diversidad microbiana y funcional del suelo, ya que pueden actuar promoviendo o disminuyendo el crecimiento de determinados microorganismos al alterar ciertas rutas metabólicas (Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Lo, 2010). En cuanto al uso de fertilizantes, estos pueden alterar el contenido de nutrientes del suelo, lo que tiene un impacto directo sobre el crecimiento de los microorganismos (T. Wu et al., 2008). Por su parte, el laboreo promueve la

deseccación y compactación del suelo, alterando su estructura y afectando a la disponibilidad de residuos vegetales, lo que se refleja en la cantidad de materia orgánica del suelo y la distribución de nutrientes en el mismo (García-Orenes et al., 2013).

Todas estas prácticas tienen un impacto en las comunidades microbianas, lo que puede tener consecuencias significativas en la salud y desarrollo de los árboles (Mercado-Blanco et al., 2018). Esto, a su vez, contribuye a la expansión y la gravedad de diversos tipos de estreses vegetales, tanto abióticos (como la erosión del suelo, la sequía y la salinidad) como bióticos (por ejemplo, la seca del olivo causada por *Verticillium*, el decaimiento de las encinas, las infecciones provocadas por *Fusarium* y la propagación de otras plagas). Estos desafíos son extremadamente difíciles de gestionar, especialmente en las condiciones climáticas típicas de Andalucía, que se caracterizan por lluvias irregulares y escasas, así como por períodos prolongados de sequía (Castro et al., 2008). Entre los posibles estreses bióticos, la verticilosis del olivo (VWO, del inglés *Verticillium Wilt of Olive*) se considera una de las enfermedades más relevantes en muchas de las principales zonas de cultivo del olivo. Se trata de una enfermedad vascular muy difícil de controlar, causada por el hongo transmitido por el suelo *Verticillium dahliae* Kleb. Dada la relevancia del cultivo del olivo en la Cuenca Mediterránea, y la expansión de este cultivo arbóreo a otras regiones de todo el mundo, los estudios sobre la epidemiología y la gestión de la VWO son de suma importancia (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). En muchos casos, los olivicultores intentan paliar las pérdidas producidas por la enfermedad eliminando los árboles afectados o muertos de cultivares susceptibles (por ejemplo, Picual) y sustituyéndolos por nuevas plantas de genotipos que muestran tolerancia al patógeno (por ejemplo, Frantoio) (Castro et al., 2008). Nuestro conocimiento sobre los mecanismos de tolerancia/resistencia de los árboles de cultivares Frantoio a *V. dahliae* ha aumentado a partir de enfoques transcriptómicos, bioquímicos e histológicos (Gharbi et al., 2017; Leyva-Pérez et al., 2018; Markakis et al., 2010; Trapero et al., 2018). Sin embargo, estos estudios sólo se refieren al papel de la genética del huésped. Por el contrario, la posible implicación de la microbiota asociada a la raíz del olivo en la tolerancia a VWO no había sido estudiada hasta la fecha de este estudio en condiciones de campo, sólo en condiciones en las que el patógeno fue

inoculado artificialmente en plantas de olivo producidas en vivero (Fernández-González et al., 2020).

Es bien sabido que el suelo es el nicho terrestre con mayor nivel de diversidad microbiana (Correa-Galeote et al., 2016; Fierer & Jackson, 2006; Garbeva et al., 2004; van der Heijden et al., 2008), y que la rizosfera es el lugar donde se producen la mayoría de las interacciones planta-microbio (Y. Yang et al., 2017). Estas interacciones pueden ser neutras o nocivas para la planta, si bien existe un gran número de microorganismos que proporcionan efectos beneficiosos para el huésped (por ejemplo, aumentar el rendimiento o reducir el estrés abiótico y biótico), por lo que generalmente se conocen como Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPM, por sus siglas en inglés). Aunque la promoción del crecimiento vegetal está más relacionada con la actividad microbiana en la rizosfera, las comunidades microbianas del suelo también son relevantes en términos de la fertilidad del mismo. En general, estos microorganismos participan en la descomposición de restos vegetales, ciclos biogeoquímicos, degradación de pesticidas y contaminantes, y la dinámica de la materia orgánica, entre otros (Bevivino et al., 2014; Jacobsen & Hjelmsø, 2014; T. Wu et al., 2008; Y. Yang et al., 2017). Por ello, los estudios sobre la microbiota del suelo están aumentando con el objetivo de identificar microorganismos con interés biotecnológico (Bashan, 1998; Compant et al., 2010).

En contraste con el microbioma asociado a la encina, bien definido en diferentes condiciones ambientales mediante tecnologías de secuenciación masiva (Cobo-Díaz et al., 2015; Curiel Yuste et al., 2012; Curiel Yuste, et al., 2014; Curiel Yuste, Fernandez-Gonzalez, et al., 2014; Fernández-González et al., 2017), hasta la fecha de este estudio nuestro conocimiento sobre la microbiota asociada al olivo era escaso y fragmentado (Abdelfattah et al., 2015, 2018; Gómez-Lama Cabanás et al., 2018, 2018; Martins et al., 2016; Müller et al., 2015; Pascazio et al., 2015; Preto et al., 2017). De hecho, sólo se disponía de unos pocos estudios sobre las comunidades bacterianas o fúngicas asociadas a órganos específicos del olivo o a la rizosfera del olivo y la mayoría no utilizaban técnicas de secuenciación masiva. Por ejemplo, Aranda y colaboradores (2011) estudiaron las comunidades bacterianas asociadas a las raíces del acebuche (*Olea europaea L. subsp. europaea var. sylvestris*), empleando la técnica de fragmentos de

restricción de longitud polimórfica terminal (T-RFLP) y aislamiento de bacterias en medios de cultivo conocidos. En otro estudio, Martins y colaboradores (2016) realizaron un cribado de las comunidades fúngicas mediante un método dependiente de cultivo en olivos del genotipo Cobrançosa. En nuestro grupo de investigación, se caracterizaron las comunidades microbianas de rizosfera y endosfera (incluyendo bacterias y hongos) de 36 genotipos de olivo, si bien se centró en un campo experimental sin incluir ningún tipo de comparación según manejos del suelo (Fernández-González et al., 2019).

Por un lado, diversos estudios han evidenciado cómo las comunidades microbianas se ven influenciadas por varios factores, como el tipo de uso del suelo (ya sea agrícola con o sin laboreo, pastos, etc.) (Acosta-Martínez et al., 2008; Paula et al., 2014), las propiedades específicas del suelo (Kuramae et al., 2012), e incluso la distancia geográfica a nivel europeo (Plassart et al., 2019). Estos efectos se han observado principalmente en herbáceas y gramíneas, y se han estudiado menos en especies de árboles cultivados en el mismo tipo de suelo (Uroz et al., 2016). En relación a este tipo de estudios, no se encuentra información sobre la relación entre diferentes genotipos dentro de una misma especie vegetal y su relación con la resistencia diferencial a patógenos en condiciones de campo. Por otro lado, en muchas ocasiones, las condiciones naturales o silvestres no suelen ser consideradas en estos estudios, y cuando se consideran, a menudo se limitan al análisis de la rizosfera o a la aplicación de técnicas dependientes de cultivo (Bastida et al., 2017; Bossio et al., 2005; Boz et al., 2013; Caliz et al., 2015; Chen et al., 2018; Landa et al., 2014; B. Liang et al., 2018). Dado que la rizosfera es un punto de gran importancia para la diversidad microbiana y para los PGPM, es fundamental investigar las comunidades que habitan en este nicho particular, así como en el suelo en general, tanto en los olivares como en los bosques silvestres cercanos. Algunas cuestiones clave que deben abordarse incluyen la posibilidad de que las comunidades microbianas de la rizosfera de plantas leñosas silvestres puedan ser una fuente de microorganismos relevantes para aplicaciones en agrobiotecnología. Además, esta investigación debe extenderse al suelo en su conjunto, con el objetivo de identificar posibles conexiones entre la gestión del suelo y las comunidades microbianas que podrían contribuir a mejorar las condiciones de cultivo del olivo. Por último, además de la gestión del suelo, el análisis del efecto rizosférico

también puede ayudar a identificar microorganismos clave para la salud de estas plantas leñosas.

Teniendo en cuenta la información anterior, nos propusimos estudiar si las comunidades microbianas de la rizosfera y del suelo (bacterias y hongos) asociadas a plantas leñosas perennes y longevas experimentan cambios cuando crecen en parcelas vecinas sometidas a prácticas de gestión del suelo nulas (encina) o agrícolas (olivo) utilizando la secuenciación masiva del gen *16S rRNA* y de la región ITS2. También se planteó probar la hipótesis de que la microbiota asociada a las raíces de olivo tenga unas características diferentes dependiendo del nivel de susceptibilidad a VWO de dos cultivares de olivo (Frantoio, tolerante a VWO; Picual, susceptible a VWO) presentes en una finca agrícola establecida en terrenos ganados a un encinar y en los que la enfermedad ha estado presente previamente.

## II.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este apartado, se presenta el diseño experimental seguido para la obtención y análisis de los datos presentados en este capítulo. Para más detalles técnicos sobre la metodología seguida, se recomienda al lector remitirse a la sección de Material y Métodos de esta Tesis Doctoral.

En este capítulo, se presentan los datos obtenidos del análisis de las comunidades microbianas de rizosfera y suelo suelto de muestras de olivo y encina, ambas especies creciendo en terrenos adyacentes sobre un suelo clasificado como Cambisol. El olivar corresponde con una finca con manejo convencional, mientras que el encinar se trata de un bosque autóctono de la zona. Las muestras analizadas en este estudio se recogieron cuando el olivo se encontraba en plena floración, en el término municipal de Mancha Real (provincia de Jaén, España) en la primavera del año 2018. Dentro de la finca de olivos, se encontraron ejemplares de dos cultivares diferentes, por un lado, Frantoio (tolerante a la verticilosis del olivo) y por otro Picual (susceptible a la verticilosis del olivo). Así, para la rizosfera, se tomaron muestras de cinco olivos de cada cultivar en la finca y cinco encinas del bosque autóctono adyacente. En el caso del suelo suelto, se tomaron cinco muestras en el encinar y otras cinco en el olivar, concretamente

en el centro de las calles del olivar y en zonas alejadas 2 metros de los árboles en el encinar. El ADN fue extraído para todas las muestras durante las 24 horas siguientes a la recogida de las mismas, mediante fluorímetro Qubit 3.0 se comprobó la calidad de la extracción y el rendimiento antes de ser enviados a secuenciación. Se secuenciaron las regiones V3-V4 del gen *16S rRNA* y la región ITS2 para la caracterización de las comunidades bacterianas y fúngicas, respectivamente. Además, se incluyeron tres réplicas de una comunidad sintética adquirida comercialmente. Por otro lado, una parte de las muestras de suelo suelto fue enviada para la determinación de los parámetros fisicoquímicos del suelo.

El análisis de las secuencias obtenidas comenzó por el control de calidad y solapamiento de las lecturas. Esto se llevó a cabo con las herramientas FASTQC v.0.11.5 y FASTX-toolkit v.0.014, eliminando aquellos nucleótidos en el extremo 3' hasta alcanzar una calidad media superior a Q25. El solapamiento se llevó a cabo con fastq-join v.1.3.1. Posteriormente, se utilizó el software SEED2 para eliminar los primers y las secuencias con ambigüedades. Además, se eliminaron aquellas secuencias ensambladas con una longitud inferior a 400 pb (bacterias) o 100 pb (hongos) y aquellas con una calidad media inferior a Q30. También se eliminaron las lecturas quiméricas y se formaron los OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) agrupando las secuencias a un 97 % de similitud. La clasificación se llevó a cabo con el método bayesiano de RDP, y su base de datos, utilizando las secuencias más abundantes de cada OTU como representantes de dichos grupos, para el caso de las bacterias y con la base de datos UNITE para el caso de hongos.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en R. Para la diversidad  $\alpha$ , se llevó a cabo una rarefacción de los datos para su normalización y se calcularon diversos índices de diversidad y riqueza, comparándolos estadísticamente mediante Kruskal-Wallis y Mann-Whitney-Wilcoxon. En el caso de la diversidad  $\beta$ , la normalización se llevó a cabo con el método TMM (*Trimmed Mean of Means*) del paquete edgeR y se utilizaron las métricas de Bray-Curtis, UniFrac y Weighted UniFrac para abordar la estructura de la comunidad. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo con la prueba de PERMANOVA (ANOVA multivariante) y BETADISPER (análisis de homogeneidad multivariante de dispersiones entre grupos). Por otra parte, los géneros procarióticos o fúngicos significativamente diferentes y biológicamente relevantes se obtuvieron con el

software STAMP, utilizando tanto una prueba para múltiples grupos (con parámetros por defecto) como comparaciones dos a dos, utilizando la prueba t de Welch y aplicando un filtrado de relevancia biológica, basado en retener aquellos taxones con una diferencia entre proporciones  $\geq 0,5$  % o un ratio de proporciones  $\geq 2$ . Por último, para abordar la posible influencia de los parámetros fisicoquímicos en las comunidades microbianas, se utilizó un análisis canónico de coordenadas principales (CAP), utilizando Weighted UniFrac para bacterias y Bray-Curtis para hongos. Las variables fisicoquímicas que se determinaron como independientes según la inflación de la varianza (VIF), fueron sometidas a una prueba ANOVA para abordar la significancia de su influencia en la comunidad. Por último, se calculó la correlación entre los parámetros significativamente diferentes y los géneros con una abundancia relativa  $\geq 0,1$  %. Aquellas correlaciones estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) con un índice *rho* de Spearman  $\geq 0,6$  se consideraron correlaciones positivas fuertes y aquellas con un índice *rho* de Spearman  $\leq -0,6$  se consideraron correlaciones negativas fuertes.

## II.3. RESULTADOS

### II.3.1. Calidad de la secuenciación de los amplicones del gen *16S rRNA* y la región intergénica ITS2

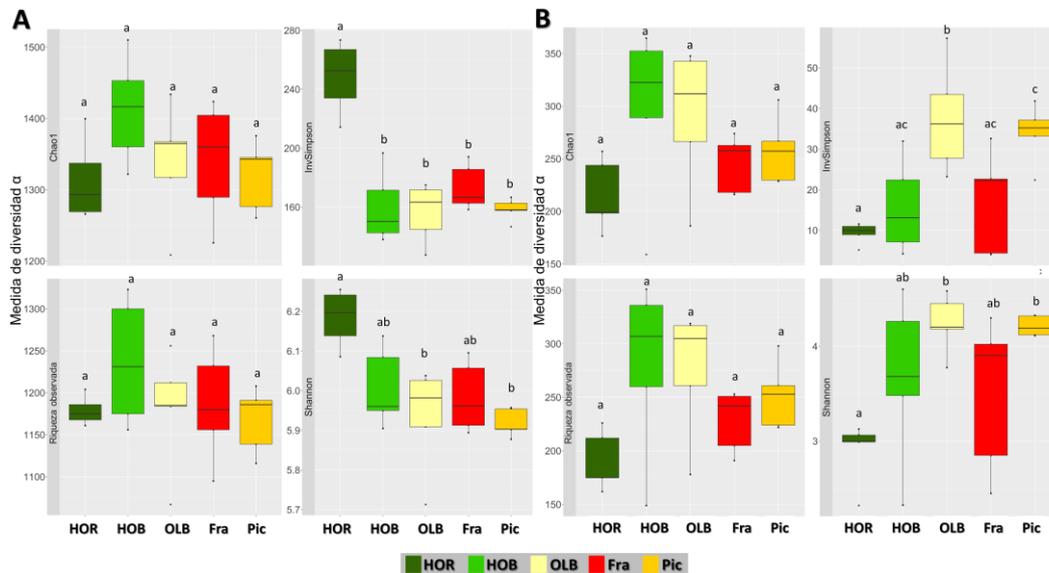
Del conjunto de datos procarióticos se obtuvo un total de 1.198.153 lecturas brutas. Tras el solapamiento, el recorte de calidad y la clasificación, el número de secuencias se redujo a 816.766, es decir, un 68,72 % de las lecturas brutas. El número máximo de secuencias por muestra fue de 40.762 y el mínimo de 14.621, lo que dio como resultado 810.623 secuencias clasificadas como procariotas (todas ellas bacterias) agrupadas en 1.795 OTUs. En el conjunto de datos eucarióticos, el número de lecturas brutas fue de 1.041.312. El solapamiento, el recorte de calidad y la clasificación redujeron el número de secuencias a 807.929 lecturas finales, el 77,59 % de las lecturas brutas. Así, el número máximo de secuencias por muestra fue de 43.605 y el mínimo de 21.316. El 98,48 % de las secuencias totales fueron clasificadas como hongos, suponiendo 795.647 secuencias que se agruparon en 988 OTUs. Por último, la comunidad sintética (mock) secuenciada por triplicado para cada biblioteca mostró los

siguientes resultados: A) En el conjunto de datos procarióticos se encontraron inicialmente 45 OTUs, de los que quedaron 5 tras la eliminación de los OTUs no correspondientes a la *mock* (*Listeria* 91,8 %, *Pseudomonas* 6,4 %, *Bacillus* 1,5 %, *Escherichia* 0,1 % y *Salmonella*, erróneamente anotada como *Buttiauxella*, 0,1 %). No se detectaron *Lactobacillus*, *Enterococcus* ni *Staphylococcus* (menos del 0,01 % según las abundancias proporcionadas por la empresa). B) En el conjunto de datos de hongos se encontraron inicialmente 49 OTUs, reduciéndose a 2 (*Saccharomyces* 99,89 % y *Saccharomyces* 0,02 %). No se detectó *Cryptococcus* (menos del 0,001 % en la muestra de referencia).

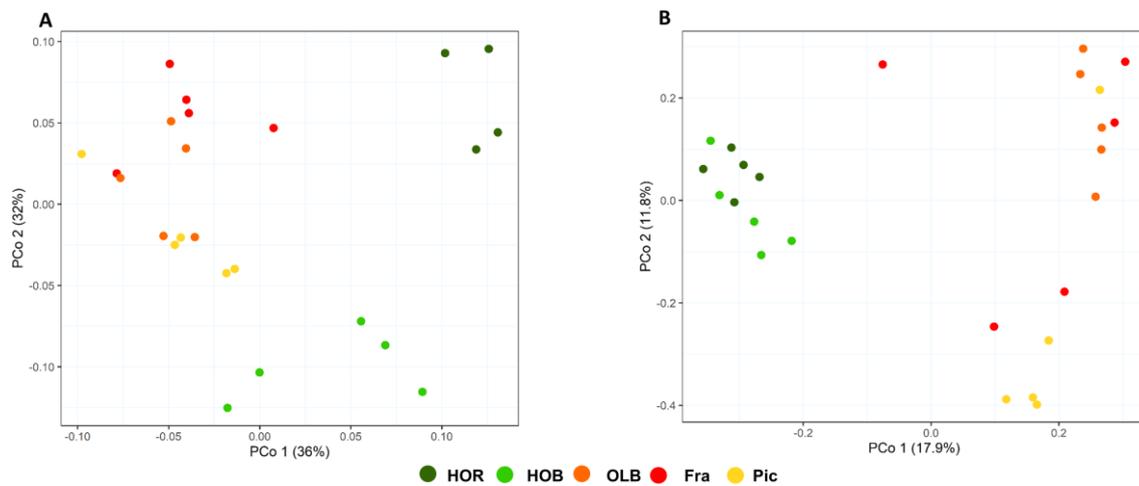
### **II.3.2. Evaluación de la diversidad bacteriana en el suelo suelto y rizosférico de olivo y encina.**

La diversidad  $\alpha$  bacteriana, tras la normalización a 14.621 secuencias, fue significativamente diferente entre grupos ( $P < 0,05$  en los índices de Shannon e Inversa de Simpson), en contraste a lo observado en la riqueza ( $P = 0,37$ ). Más concretamente, la diversidad fue significativamente mayor en la rizosfera de encina (HOR) (Figura II.1). La cobertura (estimada gracias al índice *Good's coverage*) no fue diferente entre muestras y siempre fue superior al 98 %. Además, tras integrar la información sobre los cambios en la estructura y composición de las comunidades entre los diferentes tratamientos (diversidad  $\beta$ ), también encontramos diferencias significativas ( $P = 0,001$  y  $R^2 = 0,652$  con un test PERMANOVA). Para dilucidar la relación entre grupos, se realizó una prueba BETADISPER, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la dispersión de los grupos ( $P = 0,965$ ). Para profundizar en este análisis, se elaboraron gráficos utilizando varios métodos. Entre ellos, el PCoA con distancias Weighted UniFrac devolvió una buena representación visual y explicó el 68 % de la varianza (Figura II.2). Además, se realizó una comparación por pares de la prueba PERMANOVA, utilizando las mismas métricas de disimilitud. Esta prueba proporcionó diferencias estadísticamente significativas entre algunos grupos, tal y como se esperaba a partir del gráfico PCoA. Los suelos sueltos del olivar (OLB) y la rizosfera (Fra y Pic) se agruparon sin diferencias estadísticamente significativas entre sus comunidades, como se muestra en la Figura II.2. Los suelos sueltos de encina (HOB) y su rizosfera (HOR)

parecían ser diferentes, lo que se confirmó con las comparaciones dos a dos. Por otra parte, se observaron diferencias entre estas muestras y las del olivar. Los análisis de diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  mencionados anteriormente se llevaron a cabo sin la muestra de rizosfera de encina número 2, ya que se identificó como un valor atípico con un valor de diversidad  $\alpha$  extremadamente bajo.



**Figura II.1. Índices de diversidad  $\alpha$  (A) bacteriana y (B) fúngica de cada tratamiento.** Para ambos paneles, se muestran cinco estadísticos: la mediana, dos percentiles (al 25 y al 75) y los valores máximos y mínimos. Los puntos indican valores atípicos. Todos los grupos tienen un tamaño de muestra igual a cinco, excepto HOR, que tiene cuatro muestras. Las comparaciones por pares con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$  con una prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon) se indican con diferentes letras. HOR: rizosfera de encina, HOB: suelo suelto de encina, OLB: suelo suelto de olivo, Fra: rizosfera de Frantoio, Pic: rizosfera de Picual, InvSimpson: inversa del índice de Simpson.



**Figura II.2. Gráficos de ordenación de las comunidades bacterianas y fúngicas.** (A) PCoA de las comunidades bacterianas por tratamiento en distancias Weighted UniFrac. (B) PCoA de las comunidades fúngicas por tratamiento en disimilitudes de Bray-Curtis. HOR: rizosfera de encina, HOB: suelo suelto de encina, OLB: suelo suelto de olivo, Fra: rizosfera de Frantoio, Pic: rizosfera de Picual.

### II.3.3. Estimación de la diversidad fúngica en el suelo suelto y rizosférico de olivo y encina

Para realizar los análisis de diversidad  $\alpha$  fúngica, el número de secuencias se normalizó a 21.316. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los índices de Shannon y la inversa de Simpson (Figura II.1). La comparación por pares mediante la prueba *post hoc* sobre los resultados de Kruskal-Wallis mostró que el índice de Shannon era significativamente menor en HOR en comparación con OLB y la rizosfera de Picual. La inversa de Simpson mostró el mismo comportamiento, si bien también fue significativamente mayor en OLB en comparación con HOB y la rizosfera de Frantoio (Figura II.1). La cobertura no fue diferente entre las muestras y siempre fue superior al 99 %.

Por otra parte, la diversidad  $\beta$  también fue significativamente diferente entre los grupos según la prueba PERMANOVA ( $P = 0,001$  y  $R^2 = 0,358$ ), mientras que la dispersión de los datos no fue significativamente diferente entre grupos ( $P = 0,074$ ). Los resultados

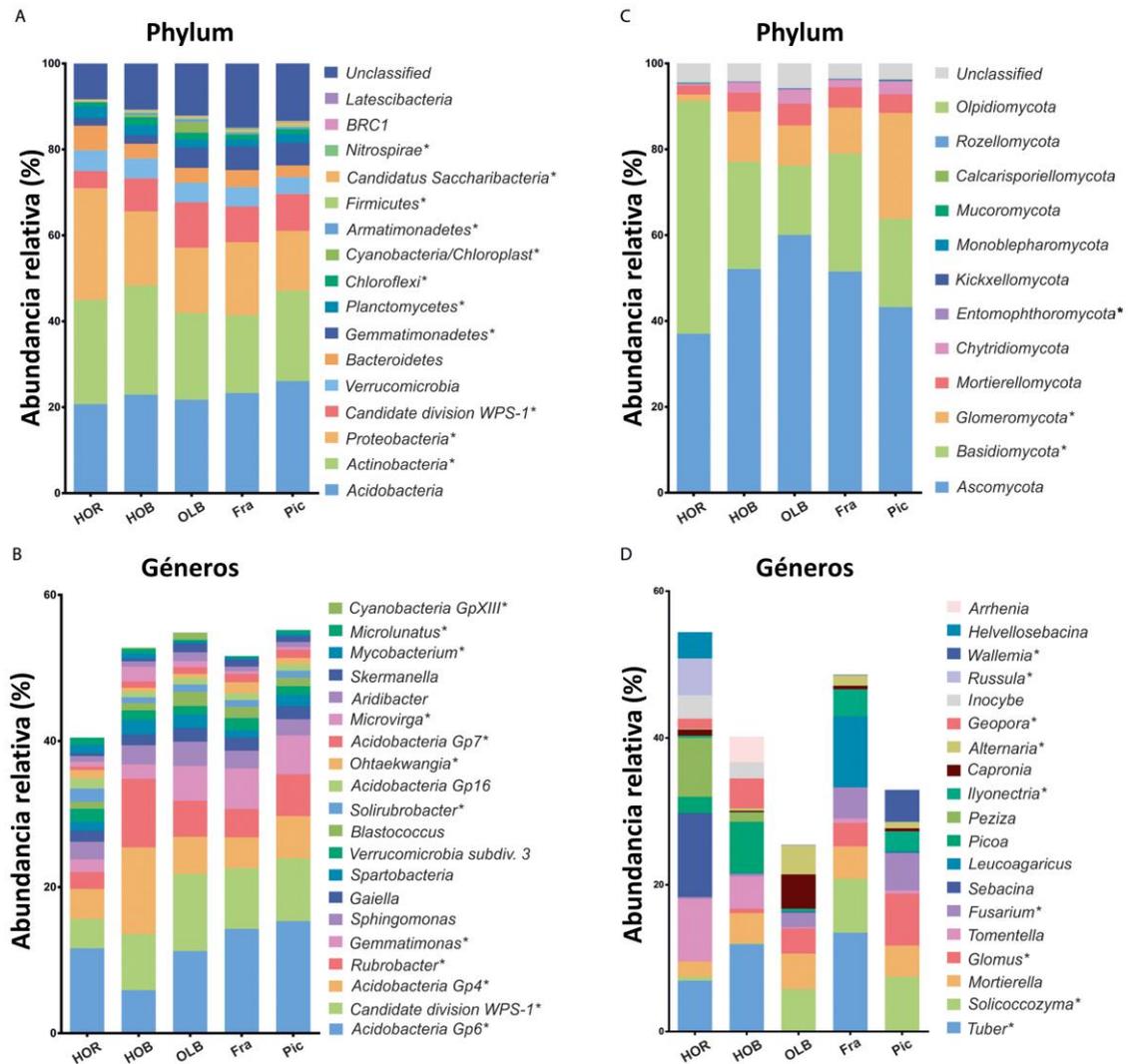
de la estructura de la comunidad se representaron con PCoA basado en las disimilitudes de Bray-Curtis y los dos primeros ejes explicaron el 29,7 % de la varianza (Figura II.2). En cuanto a las diferencias encontradas, las comunidades fúngicas mostraron un comportamiento similar al de las bacterias con respecto a la diversidad  $\beta$  en los suelos del olivar, pero diferente en las muestras de encina. Observando el gráfico obtenido, las comunidades HOB y HOR parecían ser similares entre ellas y diferentes cuando se comparaban con los suelos de olivo y, al igual que con las comunidades bacterianas, no se observaban diferencias entre los suelos de olivo. La comparación por pares de la prueba PERMANOVA utilizando las disimilitudes de Bray-Curtis confirmó estos resultados, excepto para la comparación de los suelos de encina, que fue significativa ( $P = 0,016$ ).

#### **II.3.4. Diferencias en la composición de las comunidades bacterianas**

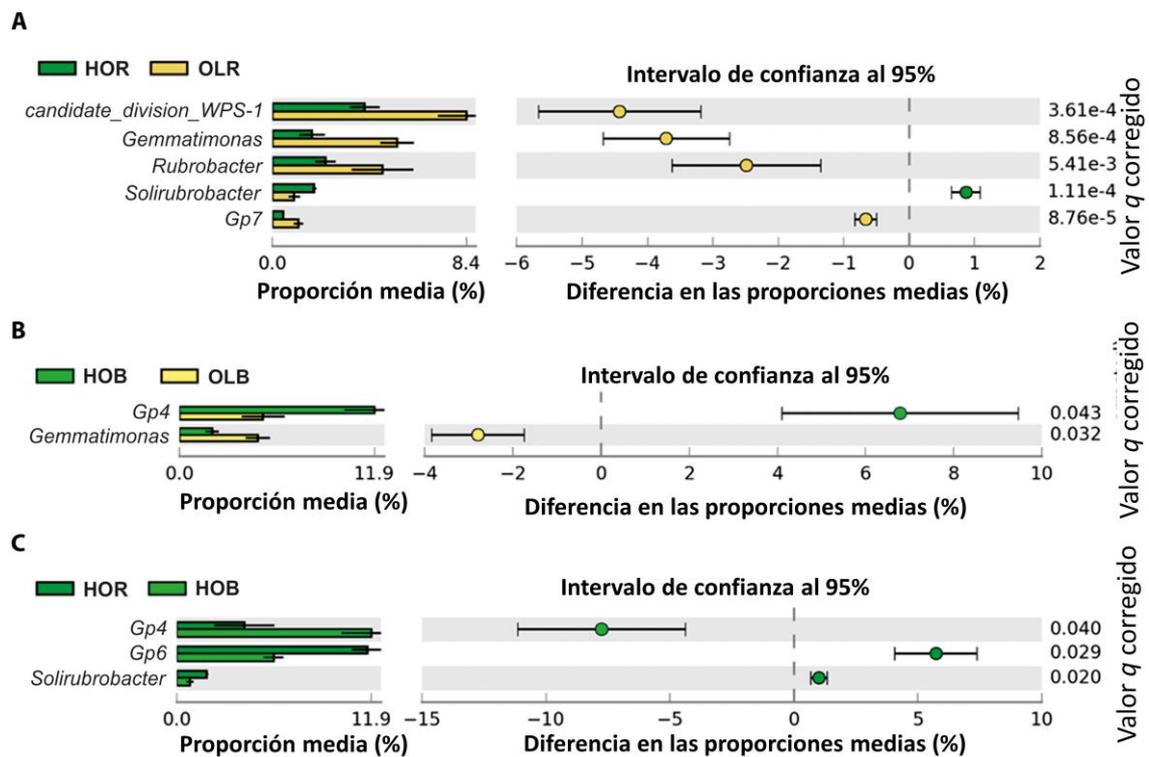
El perfil taxonómico de todos los grupos a nivel de phylum (Figura II.3) mostró una comunidad dominada por *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *candidate Division WPS-1*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* y *Gemmatimonadetes*. Estos taxones representaron en conjunto al menos el 80 % de las secuencias. Se observó que los perfiles bacterianos de las muestras de olivar fueron más similares entre sí que respecto a los del encinar, tal y como se observó en el análisis de diversidad  $\beta$ . En línea con estos resultados, y a nivel de género (Figura II.3), los más abundantes pertenecían a *Acidobacteria* (*Gp6* y *Gp4*), *candidate division WPS-1*, *Actinobacteria* (*Rubrobacter* y *Gaiella*), *Gemmatimonadetes* (*Gemmatimonas*) y *Proteobacteria* (*Sphingomonas*). Una vez más, los perfiles taxonómicos fueron más similares entre los suelos de olivar que entre los suelos HOB y HOR, si bien HOB se aproximaba más al grupo de muestras de olivo.

En cuanto a los taxones con diferencias significativas entre grupos, la comparación entre los suelos rizosféricos Pic y Fra no devolvió ningún phylum o género con diferencias estadísticamente significativas, confirmando lo observado en la diversidad  $\beta$  (valores de  $P$  corregidos por Benjamini-Hochberg FDR > 0,05). De esta

manera, consideramos las muestras de Fra y Pic como un único grupo al que denominamos suelo rizosférico de olivar (OLR), por lo que la abundancia relativa media de los géneros se calculó con 10 muestras en lugar de 5 para este grupo. Este grupo fue utilizado para realizar las comparaciones dos a dos a diferentes niveles taxonómicos. Este análisis mostró la presencia de cinco géneros con diferencias estadísticamente significativas y superando el filtro aplicado de relevancia biológica entre los suelos HOR (rizosfera de encina) y OLR (rizosfera de olivo; Figura II.4). Estos fueron un género *incertae sedis* perteneciente al phylum *candidate division WPS-1*, *Gemmatimonas*, *Rubrobacter*, *Solirubrobacter* y *Gp7*. Todos ellos eran más abundantes en OLR excepto *Solirubrobacter* que fue más abundante en HOR. La misma comparación se realizó en suelos sueltos (HOB y OLB) (Figura II.4). En este caso, sólo dos géneros mostraron diferencias significativas: *Gp4* (más abundante en HOB) y *Gemmatimonas* (más abundante en OLB). Por último, analizamos las diferencias entre suelo suelto (HOB) y rizosfera (HOR) del encinar (Figura II.4). En este caso encontramos tres géneros con diferencias biológicamente relevantes y estadísticamente significativas: *Gp4* (más abundante en HOB), *Gp6* y *Solirubrobacter* (más abundante en HOR).



**Figura II.3. Perfiles taxonómicos microbianos de suelos y rizosfera.** Perfil taxonómico bacteriano a nivel de phylum (A) y género (B); y perfil taxonómico fúngico a nivel de phylum (C) y género (D) en los cinco tratamientos estudiados. En los paneles (B) y (D), solo se muestran los géneros principales (con una abundancia relativa  $\geq 1\%$ ). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) según la prueba de ANOVA. HOR: rizosfera de encina, HOB: suelo suelto de encina, OLB: suelo suelto de olivo, Fra: rizosfera de Frantoio, Pic: rizosfera de Picual.



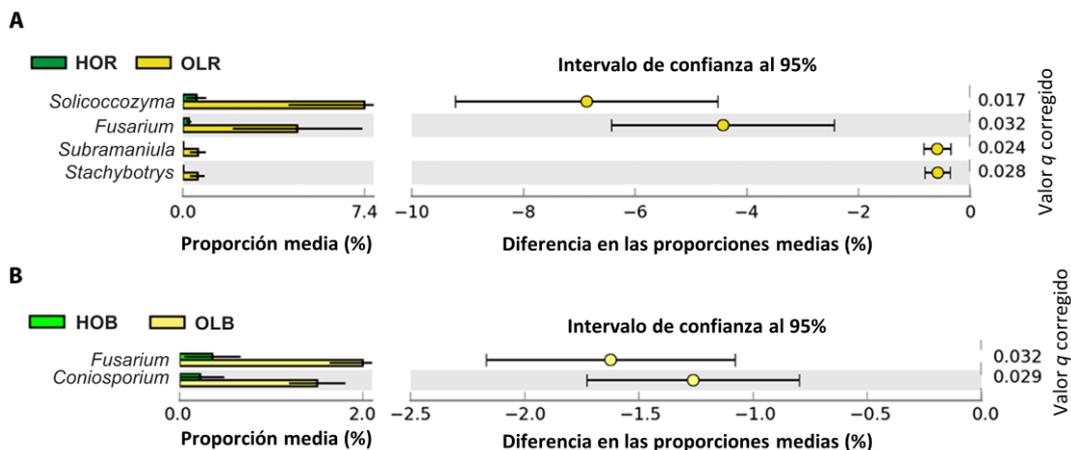
**Figura II.4. Géneros bacterianos cuya abundancia relativa difirió de manera estadísticamente significativa y biológicamente relevante entre grupos.** Los géneros mostrados presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) según la prueba t de Welch con diferencias entre proporciones  $\geq 0,5\%$  o un ratio  $\geq 2$ . Las comparaciones se indican a continuación para cada panel. Panel (A) HOR (rizosfera de encina), OLR (rizosfera de olivo); Panel (B): HOB (suelo suelto de encina), OLB (suelo suelto de olivo); Panel (C): HOR y HOB.

### II.3.5. Diferencias en la composición de las comunidades fúngicas

A nivel de phylum, las comunidades fúngicas estaban dominadas por *Ascomycota* y *Basidiomycota*, con una abundancia relativa que oscilaba entre el 63,85 % en Picual y el 91,22 % en HOR (Figura II.3). La abundancia relativa de *Ascomycota* y *Basidiomycota* difirió considerablemente en HOR con respecto a los otros suelos, siendo *Basidiomycota* el único phylum significativamente más abundante según un análisis de múltiples grupos ( $P$  ajustado  $< 0,05$  por ANOVA y Games Howell con corrección Benjamini Hochberg FDR). A nivel de género, la elevada heterogeneidad observada, reflejo de una gran variabilidad

entre grupos, dificultó la identificación de patrones o tendencias de variación en los taxones. Unos pocos géneros mostraron considerables diferencias entre las rizosferas de Picual y Frantoio, como *Tuber* o *Glomus*, aunque no fueron confirmadas a nivel estadístico al realizar un ANOVA con la prueba *post-hoc* de Games Howell. De esta manera, se consideró más informativo el análisis comparando pares de grupos, implementado en STAMP tal y como se detalló en el Apartado M.5.5.4.

Debido a la información obtenida en análisis anteriores, las muestras de suelo rizosférico de olivar se agruparon bajo el acrónimo OLR. Así, se compararon los suelos de la rizosfera (HOR frente a OLR) y los suelos sueltos (HOB frente a OLB) de encinar y olivar. Al comparar las rizosferas (HOR y OLR), cuatro géneros mostraron diferencias estadísticamente significativas y biológicamente relevantes, a saber, *Solicozozyma*, *Stachybotrys*, *Subramaniula* y *Fusarium*, todos más abundantes en la rizosfera de olivar (OLR; Figura II.5). La comparación de los suelos sueltos mostró sólo dos géneros con diferencias estadísticamente significativas y biológicamente relevantes: *Fusarium* y *Coniosporium*, siendo ambos más abundantes en el suelo OLB (Figura II.5). Finalmente, este análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los suelos HOR y HOB con respecto a los géneros fúngicos, aunque mostraron perfiles taxonómicos muy diferentes y diferencias estadísticamente significativas en la prueba de PERMANOVA por pares. Por último, resulta de interés el hecho de que *Verticillium* no se detectó en ninguna muestra.



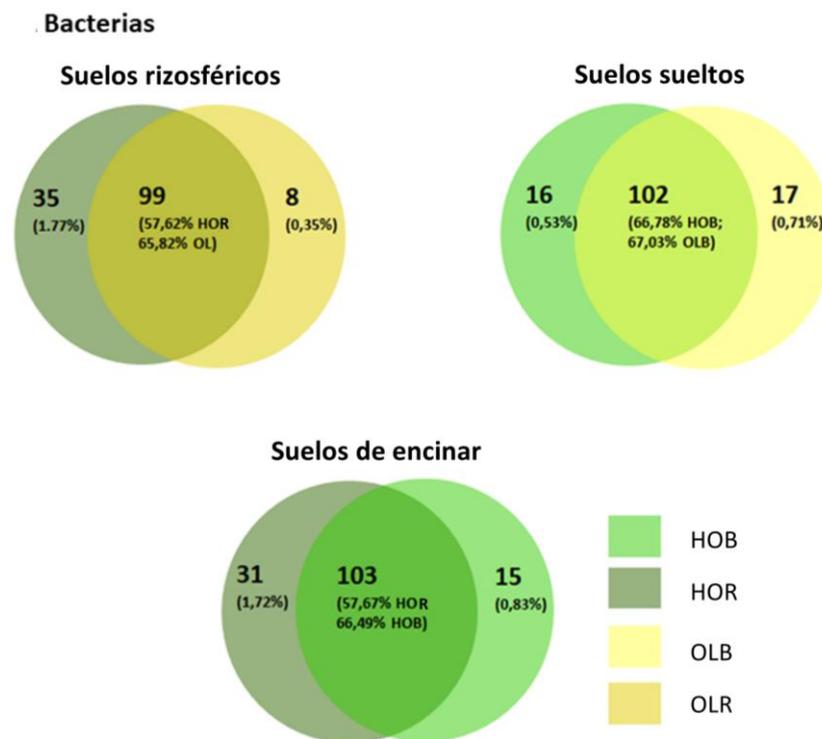
**Figura II.5. Géneros fúngicos cuya abundancia relativa difirió de manera significativa y biológicamente relevante entre grupos.** Los géneros mostrados presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) según la prueba t de Welch con diferencias entre proporciones  $\geq 0,5\%$  o un ratio  $\geq 2$ . Las comparaciones se indican a continuación para cada panel. Panel (A)HOR (rizosfera de encina), OLR (rizosfera de olivo); Panel (B): HOB (suelo suelto de encina), OLB (suelo suelto de olivo).

### II.3.6. Microbioma esencial

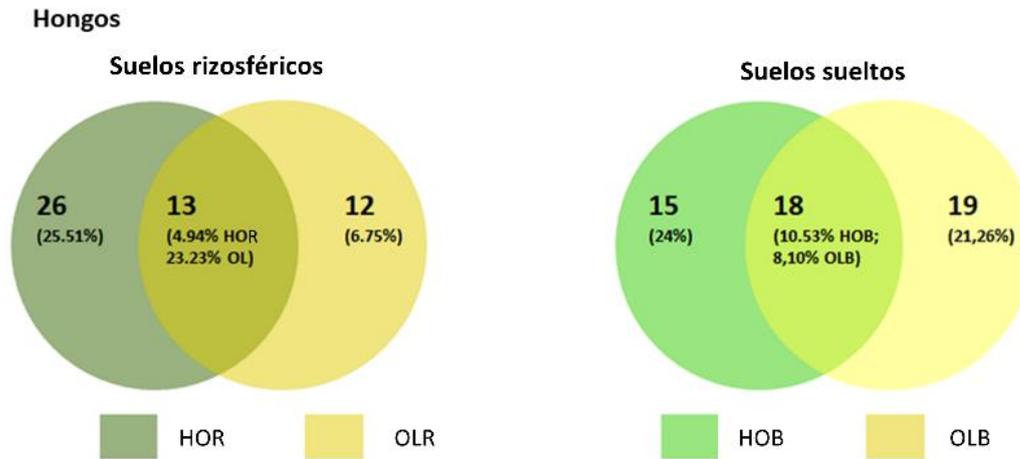
Siguiendo el esquema de análisis descrito en apartados anteriores, el bacterioma esencial compartido se determinó para los siguientes pares de grupos: HOR y OLR, HOB y OLB, HOR y HOB. En la Figura II.6, se aprecia el alto número de géneros compartidos, así como su alta abundancia relativa. De hecho, 99 géneros fueron compartidos entre los suelos rizosféricos (suponiendo un 57,62 % de las secuencias de HOR y 65,82 % de OLR), 102 entre los suelos sueltos (suponiendo un 66,78 % de las secuencias de HOB y 67,03 % de OLB) y 103 géneros entre los suelos de encinar (57,67 % HOR y 66,49 % HOB). Los géneros principales del bacterioma esencial fueron *Gp6*, *Gp4*, *Rubrobacter* y *Gemmatimonas*. Por otra parte, en ninguno de los casos los géneros no compartidos superaron el 1,77 % de las secuencias.

En cuanto al microbioma esencial, este se presenta en la Figura II.7. En este caso, el análisis solo se llevó a cabo entre HOR-OLR y HOB-OLB. La comparación HOR-HOB no

se consideró debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a nivel de género. En contraste con las comunidades bacterianas, los géneros fúngicos compartidos fueron bajos en número y en abundancia relativa para ambas situaciones. Así, el microbioma esencial estuvo representado por 13 géneros en los suelos de la rizosfera y 18 en los suelos sueltos (Figura II.7). En las muestras rizosféricas, estos géneros representaron el 4,94 % de la abundancia relativa en encina y el 23,23 % en olivo, siendo *Mortierella*, *Solicoccozyma*, *Glomus* y *Fusarium* los géneros principales. En los suelos sueltos las abundancias relativas fueron similares: 10,53 % en encina y 8,10 % en olivo, con *Mortierella*, *Capronia*, *Alternaria* y *Glomus* como géneros principales.



**Figura II.6. Diagramas de Venn para los géneros del bacterioma esencial y específico de cada condición bajo estudio.** Los números en negrita corresponden con el número de OTUs y los porcentajes entre paréntesis indican la abundancia relativa de estos OTUs en cada grupo. HOR: rizosfera de encina, HOB: suelo suelto de encina, OLB: suelo suelto de olivo, OLR: rizosfera de olivo.



**Figura II.7. Diagramas de Venn para los géneros del microbioma esencial y específico de cada condición bajo estudio.** Los números en negrita corresponden con el número de OTUs y los porcentajes entre paréntesis indican la abundancia relativa de estos OTUs en cada grupo. HOR: rizosfera de encina, HOB: suelo suelto de encina, OLB: suelo suelto de olivo, OLR: rizosfera de olivo.

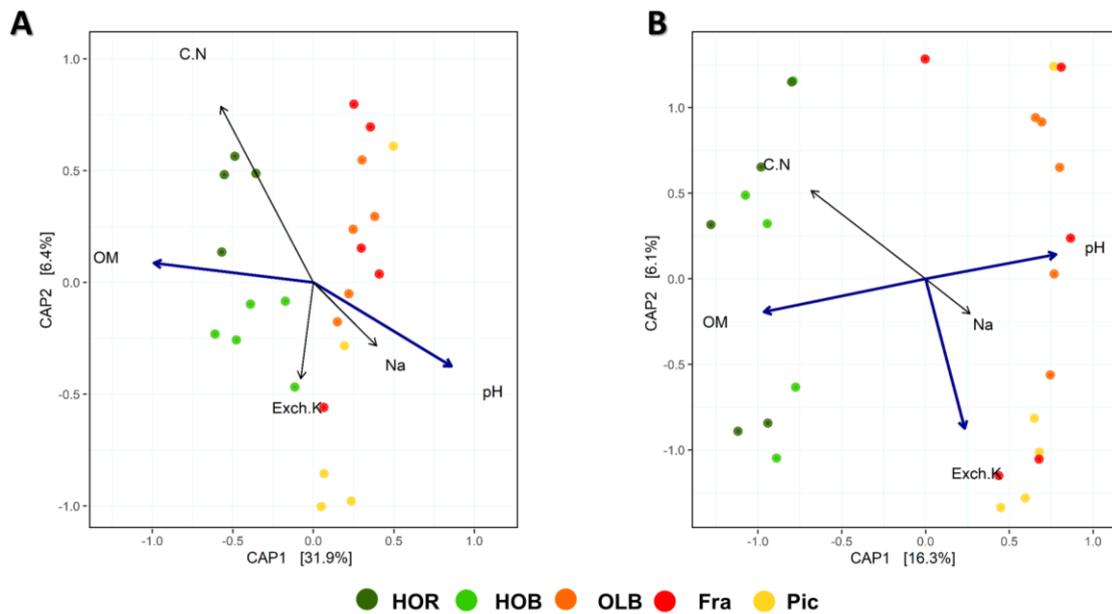
### II.3.7. Influencia de las propiedades del suelo en las comunidades microbianas

La influencia de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Tabla II.1) sobre el bacterioma se llevó a cabo analizando las muestras en dos tratamientos diferentes suelo con manejo agrícola (suelo suelto de olivos) y suelo sin manejo agrícola (suelo suelto de encinar). En primera instancia, se determinaron las variables fisicoquímicas independientes entre sí, resultando en pH, sodio, potasio intercambiable, materia orgánica y relación carbono/nitrógeno ( $VIF < 10$ ). De estas variables, solo el pH y la materia orgánica presentaron diferencias estadísticamente significativas entre suelo con manejo y sin manejo ( $P < 0,05$  con ANOVA). Los resultados se muestran en un gráfico de análisis canónico de coordenadas principales (CAP) en la Figura II.8. El eje 1 (CAP1) presentó diferencias estadísticamente significativas y se representó utilizando distancias Weighted UniFrac, que proporcionaba una mayor cantidad de varianza

explicada. Tal y como se observa en la Figura II.8, el pH y la materia orgánica afectaban a las comunidades de diferente manera, siendo las muestras de encinar las que menor pH y mayor materia orgánica presentaban.

**Tabla II.1. Características fisicoquímicas del suelo presentadas como media y desviación estándar.** OLB: suelo suelto de olivar, HOB: suelo suelto de encinar, CEC: capacidad de intercambio de cationes, fósforo determinado mediante fósforo asimilable, Exch.K: potasio de intercambio.

Parámetros	OLB	HOB
CEC (meq /100 g)	24.28 ± 1.42	34.38 ± 4.82
Ca (mEq /100 g)	19.02 ± 1.86	29.028 ± 4.26
Mg (mEq /100 g)	3.90 ± 0.44	4.07 ± 0.78
Na (mEq /100 g)	0.42 ± 0.02	0.40 ± 0.02
K (mEq /100 g)	0.95 ± 0.21	0.88 ± 0.19
Carbonatos (%)	42.57 ± 1.78	12.61 ± 9.88
Caliza activa (%)	11.41 ± 3.85	2.57 ± 2.14
Fósforo (mg/Kg)	9.32 ± 5.30	4.42 ± 0.73
Materia orgánica (%)	1.64 ± 0.25	6.82 ± 1.79
Nitrógeno orgánico (%)	0.10 ± 0.02	0.38 ± 0.10
pH 1 / 2,5	8.48 ± 0.07	8.30 ± 0.07
pH (in KCl)	7.50 ± 0.03	7.32 ± 0.11
Exch. K (mg/Kg)	350.60 ± 70.25	321.80 ± 87.05
Arcilla (%)	31.60 ± 5.46	15.66 ± 2.36
Arena (%)	18.88 ± 3.56	28.78 ± 7.36
Limo (%)	49.52 ± 2.90	53.87 ± 4.63



**Figura II.8. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP).** Se presenta un CAP para (A) la comunidad bacteriana de cada condición con distancias Weighted UniFrac y (B) la comunidad fúngica de cada condición con disimilitudes de Bray-Curtis. Las flechas representan los parámetros fisicoquímicos que fueron independientes entre sí, marcándose en azul aquellos que presentaron una influencia estadísticamente significativa en la estructura de la comunidad. HOR: rizosfera de encina, HOB: suelo suelto de encina, OLB: suelo suelto de olivo, Fra: rizosfera de Frantoio, Pic: rizosfera de Picual, OM: materia orgánica, Exch.K: potasio de intercambio, Na: sodio, C.N: ratio carbono/nitrógeno.

Este análisis se completó con el estudio de la correlación entre géneros bacterianos y los parámetros fisicoquímicos significativos. De esta manera, 20 géneros mostraron una correlación fuerte y significativa (Tabla II.2). Entre ellos, un género *incertae sedis* perteneciente al phylum *candidate division WPS-1* y *Gemmatimonas* fueron más abundantes en los suelos de olivo, estando el primero positivamente correlacionado con el pH y el segundo negativamente correlacionado con la materia orgánica.

Tabla II.2. Géneros bacterianos y fúngicos con un índice de correlación con parámetros fisicoquímicos mayor al 0,6. Los géneros que además fueron significativos en la comparación dos a dos se resaltan en negrita. OM: materia orgánica, Exch.K: potasio de intercambio.

Géneros bacterianos	Estadístico	P	rho	Parámetro
<i>Actinoplanes</i>	878,70	3,12E-04	0,66	OM
<i>Arthrobacter</i>	438,24	2,62E-07	0,83	pH
<i>Asanoa</i>	698,84	3,29E-05	0,73	OM
	4260,57	5,90E-04	-0,64	pH
<i>Bradyrhizobium</i>	842,53	2,08E-04	0,68	OM
<b><i>candidate_division_WPS-1</i></b>	<b>834,76</b>	<b>1,90E-04</b>	<b>0,68</b>	<b>pH</b>
<i>Chelativorans</i>	671,71	2,21E-05	0,74	OM
<i>Chelatococcus</i>	419,68	1,65E-07	0,84	OM
	4374,07	1,72E-04	-0,68	pH
<i>Chthonomonas/Armatimonadetes_g p3</i>	934,40	5,61E-04	0,64	pH
	4906,11	3,52E-09	-0,89	OM
<i>Geminicoccus</i>	1032,45	1,42E-03	0,60	OM
<b><i>Gemmatimonas</i></b>	<b>761,29</b>	<b>7,72E-05</b>	<b>0,71</b>	<b>pH</b>
	<b>4785,53</b>	<b>1,45E-07</b>	<b>-0,84</b>	<b>OM</b>
<i>Glycomyces</i>	4283,23	4,68E-04	-0,65	OM
<i>Gp25</i>	4595,27	7,59E-06	-0,77	OM
<i>Gp3</i>	473,75	5,98E-07	0,82	OM
<b><i>Gp6</i></b>	<b>4406,71</b>	<b>1,16E-04</b>	<b>-0,69</b>	<b>OM</b>
<i>Labrys</i>	601,37	7,16E-06	0,77	OM
<i>Litorilinea</i>	882,72	3,26E-04	0,66	OM
<i>Microvirga</i>	874,69	2,99E-04	0,66	OM
<b><i>Mycobacterium</i></b>	<b>597,35</b>	<b>6,69E-06</b>	<b>0,77</b>	<b>OM</b>
	<b>4605,77</b>	<b>6,34E-06</b>	<b>-0,77</b>	<b>pH</b>
<i>Nitrospira</i>	4278,09	4,94E-04	-0,65	OM
<i>Planctopirus</i>	922,15	4,95E-04	0,65	OM
	4238,53	7,34E-04	-0,63	pH
Géneros fúngicos	Estadístico	Valor de p	rho	Parámetro
<i>Acrophialophora</i>	835,88	1,93E-04	0,68	OM
	4319,85	3,17E-04	-0,66	pH
<b><i>Alternaria</i></b>	<b>897,16</b>	<b>3,81E-04</b>	<b>0,65</b>	<b>pH</b>
<i>Arthrobotrys</i>	4542,65	1,78E-05	-0,75	OM
<i>Ascorhizoctonia</i>	981,16	8,88E-04	0,62	pH
<i>Bradomyces</i>	980,08	8,79E-04	0,62	pH
	4274,11	5,14E-04	-0,64	OM
<i>Budhanggurabania</i>	1016,90	1,24E-03	0,61	pH
<i>Coniooessia</i>	4491,40	3,78E-05	-0,73	pH

## CAPÍTULO II

<i>Coniosporium</i>	693,78	3,06E-05	0,73	OM
	946,15	6,31E-04	0,64	pH
<i>Coprinus</i>	878,65	3,12E-04	0,66	Exch.K
<i>Dominikia</i>	4683,31	1,49E-06	-0,80	OM
<i>Entoloma</i>	4419,75	9,84E-05	-0,70	OM
<i>Exophiala</i>	997,11	1,03E-03	0,62	pH
<b><i>Fusarium</i></b>	<b>692,86</b>	<b>3,02E-05</b>	<b>0,73</b>	<b>pH</b>
	<b>4498,15</b>	<b>3,44E-05</b>	<b>-0,73</b>	<b>OM</b>
<i>Geminibasidium</i>	4321,76	3,11E-04	-0,66	pH
<i>Geosmithia</i>	4197,34	1,09E-03	-0,61	Exch.K
<b><i>Glomus</i></b>	<b>4532,31</b>	<b>2,08E-05</b>	<b>-0,74</b>	<b>OM</b>
<i>Halosarpheia</i>	4233,81	7,69E-04	-0,63	OM
<i>Hyaloseta</i>	834,77	1,90E-04	0,68	pH
<b><i>Ilyonectria</i></b>	<b>4282,11</b>	<b>4,74E-04</b>	<b>-0,65</b>	<b>OM</b>
<i>Lempholemma</i>	1016,17	1,23E-03	0,61	pH
<i>Lophiostoma</i>	1021,72	1,29E-03	0,61	MO
<i>Lophiotrema</i>	965,63	7,65E-04	0,63	pH
	4367,40	1,86E-04	-0,68	OM
<i>Lotinia</i>	796,06	1,20E-04	0,69	pH
	4417,11	1,02E-04	-0,70	OM
<i>Malassezia</i>	4241,91	7,10E-04	-0,63	OM
<i>Malbranchea</i>	4568,49	1,18E-05	-0,76	OM
<i>Metacordyceps</i>	4337,54	2,61E-04	-0,67	OM
<i>Peziza</i>	651,81	1,63E-05	0,75	OM
	4190,01	1,16E-03	-0,61	pH
<i>Podospora</i>	945,58	6,28E-04	0,64	OM
<i>Pyrenochaeta</i>	4207,05	9,92E-04	-0,62	OM
<i>Rhinocladiella</i>	1014,51	1,21E-03	0,61	OM
	4416,37	1,03E-04	-0,70	pH
<i>Schwanniomyces</i>	1004,43	1,10E-03	0,61	Exch.K
<i>Setophaeosphaeria</i>	892,78	3,64E-04	0,66	pH
<b><i>Solicoccozyma</i></b>	<b>4657,31</b>	<b>2,48E-06</b>	<b>-0,79</b>	<b>OM</b>
<b><i>Stachybotrys</i></b>	<b>974,54</b>	<b>8,33E-04</b>	<b>0,63</b>	<b>pH</b>
	<b>4645,78</b>	<b>3,09E-06</b>	<b>-0,79</b>	<b>OM</b>
<b><i>Subramaniula</i></b>	<b>825,36</b>	<b>1,71E-04</b>	<b>0,68</b>	<b>pH</b>
	<b>4586,96</b>	<b>8,73E-06</b>	<b>-0,76</b>	<b>OM</b>
<i>Talaromyces</i>	953,83	6,81E-04	0,63	OM
<i>Thanatephorus</i>	967,48	7,78E-04	0,63	pH
	4324,62	3,01E-04	-0,66	OM
<i>Trichophaea</i>	625,77	1,08E-05	0,76	OM
<b><i>Tuber</i></b>	<b>932,95</b>	<b>5,53E-04</b>	<b>0,64</b>	<b>OM</b>
<i>Wallemia</i>	4323,61	3,05E-04	-0,66	OM
<i>Xanthomendoza</i>	884,71	3,34E-04	0,66	Exch.K

En cuanto a la relación de los parámetros fisicoquímicos con las comunidades fúngicas, los parámetros que influyeron significativamente la estructura de la comunidad fueron el pH, material orgánica y potasio de intercambio. De forma similar a las comunidades bacterianas, CAP1 fue el eje que presentó diferencias estadísticamente significativas en la ordenación de las muestras. En este caso, el CAP se llevó a cabo con disimilitudes de Bray-Curtis y los dos primeros ejes explicaron un 28,5 % de la varianza (Figura II.8). En este caso, 41 géneros fúngicos mostraron una fuerte correlación y significativa con alguno de los parámetros estudiados. Todos ellos presentaron una correlación positiva con el pH y negativa con la materia orgánica, excepto *Coniosporium* y *Solicoccozyma*, el primero correlacionado positivamente sólo con el pH y el segundo correlacionado negativamente sólo con la materia orgánica (Tabla II.2)

## II.4. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar cómo, bajo las mismas condiciones pedológicas y climáticas, las comunidades microbianas de la rizosfera y el suelo suelto se ven afectadas por la especie de árbol y el manejo agrícola. Aunque este objetivo ha sido abordado previamente en especies herbáceas (Acosta-Martínez et al., 2008; Berg & Smalla, 2009; Kuramae et al., 2012), nuestro conocimiento en el caso de plantas leñosas es escaso. Además, se quiso estudiar la comunidad microbiana asociada a dos variedades de olivo con resistencias diferenciales al patógeno *Verticilium dahliae*, en busca de posibles diferencias que se relacionen con dicha resistencia o susceptibilidad.

En cuanto a la comunidad bacteriana, el manejo agrícola afectó a la comunidad en términos de diversidad  $\alpha$ . Concretamente, se observó que la rizosfera de encina mostró una diversidad bacteriana significativamente mayor respecto al suelo suelto del encinar. Sin embargo, esta marcada diferencia no se observó en el suelo del olivar sometido a manejo agrícola convencional. La presencia de una mayor diversidad microbiana en la rizosfera se puede relacionar con el efecto rizosférico, como la secreción de exudados radiculares que promueven el crecimiento y actividad microbiana (Berg & Smalla, 2009; Vives-Peris et al., 2019). En el suelo del olivar, el uso de técnicas agrícolas como el arado del suelo pueden afectar a estas interacciones

planta-microorganismo, diluyendo el efecto de la rizosfera observado en un suelo sin perturbación humana. En este sentido, ha sido ampliamente demostrado que el uso de fertilizantes y pesticidas pueden alterar directamente la comunidad microbiana del suelo, debido a la alteración de los niveles de nutrientes del mismo o el efecto directo sobre ciertas rutas metabólicas microbianas (Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Lo, 2010; Medo et al., 2021; T. Wu et al., 2008). Estas diferencias entre grupos también fueron observadas en el análisis de diversidad  $\beta$ , por lo que el manejo agrícola también ejerció un efecto sobre la estructura de la comunidad bacteriana. Esto apoya lo descrito por diversos estudios sobre la influencia del manejo agrícola en las comunidades microbianas de la rizosfera y del suelo suelto (Caliz et al., 2015; Chen et al., 2018; Landa et al., 2014; Schmidt et al., 2019).

En cuanto a la comunidad fúngica, esta mostró un patrón opuesto al observado en la comunidad bacteriana, siendo el suelo de la rizosfera de encina el menos diverso. Es importante destacar que nuestro conocimiento sobre la estructura y funcionamiento de los hongos en la rizosfera a fecha de este estudio resulta limitado (Bakker et al., 2013). Por lo tanto, es difícil determinar cómo se estructuran las comunidades fúngicas en este nicho. Se podría especular que en suelos no agrícolas y en ausencia de procesos de perturbación de la estructura del suelo (por ejemplo, sin laboreo), los hongos podrían desarrollar redes de micelio más estables que les permitan colonizar y persistir en el suelo, evitando así el establecimiento de otros hongos. Continuando con la comunidad fúngica, es interesante mencionar que no se observaron diferencias entre rizosfera y suelo suelto de encinar, tal y como ocurrió en el caso de bacterias. En resumen, nuestros resultados muestran que las comunidades fúngicas y bacterianas respondieron de manera diferente según el manejo del suelo. La diversidad bacteriana fue mayor en la rizosfera de encina y se pudieron distinguir tres grupos (suelo de olivar, suelo suelto del encinar y rizosfera de encina), mientras que la diversidad fúngica fue menor y solo se diferenciaron dos grupos de muestras (olivar y encinar). Estos resultados concuerdan con lo mostrado en el trabajo de Urbanová y colaboradores, donde se sugiere que las comunidades bacterianas y fúngicas no se encuentran determinadas por los mismos factores ambientales (Logue et al., 2015; Urbanová et al., 2015). Futuros estudios serán necesarios para elucidar cómo las prácticas agronómicas individuales (riego, labranza,

uso de herbicidas o pesticidas específicos, etc.), una combinación de algunas de ellas o todas en conjunto contribuyen a explicar las diferencias observadas. Además, al comparar la rizosfera de encina con la rizosfera de olivo, la especie de árbol representa una fuente de variación en la comunidad microbiana. Esta fuente de variabilidad se tuvo en cuenta en el diseño experimental presentado en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral.

Los efectos del manejo agrícola del suelo se reflejaron también a nivel de las propiedades fisicoquímicas del mismo. Concretamente, se observó un contenido en materia orgánica significativamente mayor en el encinar respecto al olivar, así como un menor pH. Los niveles de materia orgánica encontrados concuerdan con el tipo de manejo aplicado, ya que, en el olivar manejado de manera convencional, el suelo queda sin ningún tipo de cubierta que aporte materia orgánica al suelo. Por contraposición, en el encinar no se llevó a cabo ningún trabajo de retirado de los restos vegetales. Estos dos parámetros fisicoquímicos, junto con el potasio intercambiable en el caso particular de las comunidades fúngicas, fueron los responsables de los cambios microbianos observados en la mayoría de los taxones al comparar el suelo de encinar frente al de olivar. En primer lugar, abordaremos el papel del pH. Existe un amplio número de trabajos que respaldan el pH como uno de los principales factores fisicoquímicos que influyen las comunidades microbianas del suelo (Fierer & Jackson, 2006; Griffiths et al., 2011; Jeanbille et al., 2016; Lauber et al., 2013). Así, nuestros resultados muestran que los géneros bacterianos *Gemmatimonas* y *Candidate Division WPS-1*, así como los géneros fúngicos *Fusarium*, *Subramaniula* y *Stachybotris*, se correlacionaron positivamente con el pH, lo que respalda su mayor abundancia relativa en los suelos agrícolas. Según esto, el género *Gemmatimonas* se vio afectado negativamente por el contenido de materia orgánica, una situación que también se observó para los géneros fúngicos *Solicoccozyma*, *Fusarium*, *Subramaniula* y *Stachybotris*. Respecto a estos géneros, existe poca información sobre su relación con las características fisicoquímicas del suelo. En el caso de *Gemmatimonas*, este género ha sido poco estudiado, ya que el phylum al que pertenece fue descrito recientemente (2003) y sólo se conocen tres cepas pertenecientes a este género (Zeng et al., 2015, 2021; H. Zhang et al., 2003). Debido a esto, es difícil asegurar cuál es su comportamiento en distintos tipos de suelo, si bien se

ha descrito una mayor asociación de este género con suelos agrícolas (DeBruyn et al., 2011).

Se observaron otros géneros que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos pero que no se vieron correlacionados con los parámetros fisicoquímicos del suelo estudiados. Estos fueron principalmente géneros bacterianos: *Solirubrobacter*, *Rubrobacter*, *Gp7* y *Gp4*. En cuanto a estos géneros, destaca *Rubrobacter*, que fue significativamente más abundante en el suelo rizosférico agrícola (OLR frente a HOR). Dentro de este género se han descrito diversas cepas capaces de colonizar ambientes extremos, como suelos contaminados (especialmente con zinc) o áridos (Holmes et al., 2006; X. Li et al., 2015; Moffett et al., 2003). Esto respaldaría su presencia en el suelo agrícola por el uso de productos agroquímicos tales como fertilizantes inorgánicos.

En cuanto al efecto rizosférico, este solo se observó en las comunidades bacterianas bajo condiciones naturales, esto es, en la rizosfera de encinas. A pesar de que este efecto haya sido estudiado tanto en suelos nativos como con manejo agrícola, nuestros datos no apoyan este fenómeno en el cultivo del olivo bajo las condiciones de estudio aquí descritas (Berg & Smalla, 2009; Fierer & Jackson, 2006; Jeanbille et al., 2016; Lauber et al., 2009). Una posible explicación podría estar relacionada con las prácticas agrícolas aplicadas al suelo del olivar. En cuanto al efecto rizosférico en el suelo nativo, *Solirubrobacter* fue el único género significativamente más abundante en la rizosfera de encina, mientras que *Gp6* fue significativamente más abundante tan solo respecto al suelo suelto.

El genotipo de la planta es un factor clave en la estructuración de sus comunidades microbianas asociadas (Bulgarelli et al., 2012; Engelbrektson et al., 2012), y los olivos no son una excepción (Fernández-González et al., 2019). Sorprendentemente, no se encontraron diferencias en las comunidades bacterianas o fúngicas de la rizosfera de los cultivares Frantoio y Picual bajo las condiciones evaluadas en este estudio en ninguno de los análisis realizados (diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  y composición de las comunidades). Así, bajo las prácticas intensivas de manejo del suelo implementadas en el olivar (es decir, uso de agroquímicos, arado del suelo, etc.), las diferencias esperadas en las comunidades microbianas de la rizosfera impulsadas por el

cultivar/genotipo no son observables. Esta ausencia de diferencias podría deberse al manejo agrícola llevado a cabo sobre el suelo, donde el movimiento del suelo por el arado puede dificultar la detección de diferencias. Por otra parte, es posible que las diferencias no se hayan podido detectar en la rizosfera, pero que sí fuera posible en otros tejidos vegetales, como en la endosfera radicular. Este microhábitat es más selectivo a los microorganismos presentes en él, debido a su mayor protección frente a cambios ambientales y más estrecha relación con la planta (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). Por último, se han descrito casos donde no se han encontrado diferencias entre la rizosfera de distintas especies leñosas como son las hayas (*Fagus sylvatica*) y las píceas de Noruega (*Picea abies*) en condiciones sin manejo agrícola (Uroz et al., 2016). En definitiva, bajo las condiciones de estudio aquí contempladas, no parece haber un mecanismo de resistencia a la verticilosis asociado con el microbioma de la rizosfera de Frantoio.

Por último, la rizosfera de encinas y olivos compartían 99 géneros bacterianos y 13 géneros fúngicos. Dado que se sabe que la diversidad bacteriana es mayor que la diversidad fúngica, nuestro resultado era en cierto modo esperado. Sin embargo, mientras que el bacterioma esencial estaba compuesto por más del 50 % de las secuencias totales, el micobioma esencial sólo tenía alrededor del 20 % de las secuencias. Aunque se observó un patrón común con muy pocos géneros específicos para cada especie arbórea y con una abundancia relativa baja. Así, las principales diferencias entre los tratamientos (HOR, HOB, OLB, Pic y Fra) se debieron a las diferencias en la abundancia relativa de los géneros y no a una diferencia en la presencia/ausencia de los mismos. Esta situación es similar a la descrita para las comunidades microbianas en la comparación entre píceas y hayas (Uroz et al., 2016).

En resumen, nuestros resultados muestran que: (i) el efecto de la planta sólo se detectó en la rizosfera de encina; (ii) los suelos sueltos del olivar y del encinar mostraron diferencias en la composición de su comunidad microbiana; y (iii) sólo se encontraron diferencias mínimas entre el suelo suelto y rizosférico del olivar. Por lo tanto, la hipótesis de que la microbiota del suelo asociada al olivo se vea influenciada en función del nivel de susceptibilidad a la verticilosis de los cultivares no pudo demostrarse, al menos en las condiciones experimentales aquí estudiadas. Como perspectiva futura, sería de

interés abordar el estudio de estas diferencias en las comunidades microbianas endofíticas de la raíz, ya que este compartimento se encuentra más protegido de efectos externos que puedan alterar su estructura y composición y está más influenciado por la planta.

## **CAPÍTULO III**



## **CAPÍTULO III: Biodiversidad del olivar: la influencia de la agricultura ecológica en las comunidades microbianas.**

### **III.1. INTRODUCCIÓN**

El cultivo del olivo (*Olea europaea L. subsp. europaea var. europaea*) ha sido durante milenios un elemento clave en la nutrición, economía y cultura de muchas regiones, especialmente en países ubicados en la Cuenca Mediterránea (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Dentro de estos países, España es el mayor productor y exportador de aceite de oliva, representando el 40 % de la producción mundial (FAO. *FAOSTAT, production statistics.*, 2021). El aceite de oliva es uno de los principales componentes de la dieta mediterránea, que recientemente ha sido declarada Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad ([www.unesco.org](http://www.unesco.org)). Además, su consumo está experimentando una expansión destacada y una creciente atención debido a los conocidos beneficios para la salud humana. Por ejemplo, se ha demostrado ampliamente que el consumo regular de aceite de oliva virgen extra promueve un mejor perfil lipídico, reduciendo con éxito el riesgo de trombosis (Pérez-Jiménez et al., 2007). Desde una perspectiva agronómica, el cultivo del olivo requiere menos riego y niveles de nutrientes que otros árboles y su implementación en agrosilvicultura puede proporcionar muchos servicios ecosistémicos (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Todo esto ha llevado a una expansión del olivo fuera de las áreas de cultivo tradicionales, en regiones de Sudáfrica, China, Japón y Australia (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011).

En las últimas décadas, los sistemas de cultivo del olivo han sufrido cambios importantes para aumentar el rendimiento y la producción, lo que ha llevado a la implementación de cultivos de alta densidad (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). En general, la mayoría de las plantaciones de olivos se gestionan de manera convencional, involucrando el uso de pesticidas, herbicidas, con laboreos de profundidad y desbrozado (Zipori et al., 2020). Estas prácticas agronómicas tienen un amplio impacto en el medio ambiente, no solo en términos de liberación de carbono, sino también en cuanto a la biodiversidad (Gabel et al., 2016). Estas prácticas también

afectan a la compactación y el contenido de nutrientes y agua del suelo, factores que, entre otros, ejercen un efecto directo sobre las comunidades microbianas del suelo, así como sobre aquellas directamente asociadas a los árboles (Berg et al., 2014; Bevivino et al., 2014; Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Y. Liang et al., 2015; Lo, 2010). En este sentido, se sabe que las interacciones con los microorganismos son esenciales para la salud de los árboles, incluidas las que ocurren en la rizosfera y la endosfera de las raíces (Berg et al., 2014, 2017; Compant et al., 2010). De hecho, existe una amplia evidencia del papel de la microbiota asociada a las raíces en la promoción del crecimiento, la adquisición de nutrientes y la protección contra patógenos (Berg et al., 2014; Compant et al., 2010; Mercado-Blanco et al., 2018; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

La gestión orgánica de los olivares está siendo una práctica cada vez más habitual en pos de reducir las problemáticas asociadas a un manejo convencional del cultivo. En este sentido, las enmiendas de estiércol constituyen una fuente muy completa de nutrientes, incluyendo nitrógeno, fósforo, potasio, micronutrientes y materia orgánica (Dadrasnia et al., 2021). Además de ser un suministro nutricional rico, la enmienda con estiércol promueve el enriquecimiento en materia orgánica del suelo, mejorando así la capacidad de retención de agua, porosidad o agregación, entre otras propiedades (Celik et al., 2004; Tejada et al., 2008). Esto se traduce en una serie de efectos beneficiosos indirectos, como prevenir la erosión del suelo, una cuestión de suma importancia en la Cuenca Mediterránea debido a su régimen de lluvias torrenciales esporádicas que se alternan con períodos de sequía y riesgo de desertificación (Celik et al., 2010). Algunos de estos efectos beneficiosos se producen a través de la modificación de la microbiota del suelo. Por ejemplo, se ha demostrado que la estructura del suelo mejora con las enmiendas orgánicas, asociándose a un aumento en la abundancia de hongos (S. T. Lucas et al., 2014). Además, las enmiendas orgánicas pueden reducir la gravedad, incidencia e incluso suprimir por completo los patógenos del suelo, siendo una fuente de antagonistas microbianos efectivos contra fitopatógenos (Vida et al., 2020). En relación a esto, también se ha demostrado que la aplicación de enmiendas orgánicas puede aumentar la actividad de los microorganismos del suelo (Chernov & Semenov, 2021). En resumen, la gestión orgánica en general, y las aportaciones de estiércol en

particular, pueden generar importantes beneficios para los sistemas agrícolas a través de una variedad de mecanismos interconectados.

Como se mencionó anteriormente, los niveles de nutrientes del suelo afectan directamente a las comunidades microbianas del mismo. Por lo tanto, cabe esperar que las enmiendas con estiércol modifiquen la microbiota del suelo y de las raíces. Esta hipótesis ha sido demostrada ampliamente para plantas herbáceas, pero ha sido escasamente estudiada para especies leñosas (H. Li et al., 2021; Qiao et al., 2019; Sharaf et al., 2021; J. Sun et al., 2014; Windisch et al., 2021; X. Wu et al., 2022). Aunque existen varios estudios sobre el efecto de la enmienda con estiércol en el rendimiento del olivo (Atmaca et al., 2021; Chatzistathis et al., 2020; Hadawi et al., 2021; Pekcan et al., 2009; Zipori et al., 2020), poco se sabe sobre su influencia en el microbioma de las raíces de esta especie leñosa. La mayoría de los estudios realizados en ese sentido se basan en técnicas dependientes de cultivo (Ahmad Yassin Majjami et al., 2020; Hassan et al., 2015; Montes-Borrego et al., 2013), se centran en un grupo específico de bacterias (Caliz et al., 2015; Sofo et al., 2019) o en compartimentos vegetales distintos de la raíz, como es el caso del xilema (Fausto et al., 2018; Llimós et al., 2021).

Comprender hasta qué punto la comunidad microbiana de las raíces de los olivos está moldeada por las enmiendas de estiércol puede contribuir a tener una imagen más completa de los impactos de la gestión orgánica en un cultivo leñoso tan importante y longevo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del manejo agrícola (específicamente, el manejo orgánico frente al manejo convencional) en el microbioma de las raíces de los olivos. Para ello, se abordaron los siguientes objetivos: evaluación del impacto de la enmienda de estiércol de oveja en (i) la composición y estructura de la comunidad microbiana (bacterias y hongos) asociada a las raíces (rizosfera y endosfera), (ii) la alteración de las funciones potenciales (predichas mediante FAPROTAX) de la comunidad bacteriana de las raíces y (iii) la biomasa microbiana en la rizosfera de los olivos, en condiciones de campo. En este sentido, quisimos probar la hipótesis de un posible efecto positivo de la enmienda de estiércol de oveja en las comunidades microbianas asociadas a las raíces de olivo, evaluándolo mediante el estudio de la diversidad, las funciones metabólicas, la biomasa microbiana y las interacciones microbianas con redes de coocurrencia.

### III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este apartado, se presenta el diseño experimental seguido para la obtención y análisis de los datos presentados en este capítulo. Para más detalles técnicos sobre la metodología seguida, se recomienda al lector remitirse a la sección de Material y Métodos de esta Tesis Doctoral.

En el presente capítulo, se analizaron datos de secuenciación masiva de amplicones para la identificación de las comunidades bacterianas y fúngicas de la raíz (rizosfera y endosfera) de olivos (variedad Picual) cultivados bajo diferentes manejos de suelo. Por un lado, se muestreó una finca con manejo orgánico que comprendía el uso de fertilizantes ecológicos y la aplicación de una enmienda orgánica (OM) de estiércol de oveja a razón de 350 kg por hectárea. Por otro lado, una finca con manejo convencional (CM), cuyas prácticas agrícolas incluían tratamientos con herbicidas y pesticidas y arado mecánico. En esta, la última aplicación de herbicidas se realizó 6 meses antes del muestreo. Ambas fincas carecían de riego por goteo. El muestreo se realizó en el otoño de 2020 en el municipio de Lupión, provincia de Jaén, en el sur de España.

Para cada finca, se seleccionaron 8 árboles de la variedad Picual para el análisis. De cada árbol se obtuvieron muestras de la rizosfera y endosfera. Tanto las muestras de suelo como de raíces se almacenaron a 4 °C y se procesaron en las siguientes 48 horas tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos de esta Tesis Doctoral. Resumidamente, las raíces fueron esterilizadas superficialmente y molidas. Se extrajo el ADN tanto de la endosfera como de la rizosfera y fue enviado para su secuenciación al Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC, Granada), donde se utilizó la tecnología Illumina MiSeq (2x275 PE). Se secuenciaron las regiones V3-V4 del gen *16S rRNA* y la región ITS2 para la caracterización de las comunidades bacterianas y fúngicas, respectivamente. Además, se incluyeron tres réplicas de una comunidad sintética adquirida comercialmente. Por último, se obtuvieron tres muestras de suelo suelto de cada finca que fueron utilizadas para realizar análisis fisicoquímicos y de contenido de fitosanitarios en L.A.B Innovación Analítica (una empresa de Tentamus Company,

Almería, España). Para procesar las lecturas obtenidas, se siguieron los pasos del tutorial asociado a la librería Micro4all, cuyo funcionamiento se ha detallado ampliamente en el capítulo I de esta Tesis Doctoral. Siguiendo este tutorial se llevó a cabo el filtrado de calidad de las secuencias, la inferencia de los ASVs con DADA2, la eliminación de secuencias del hospedador y secuencias mal asignadas (según los resultados de la comunidad sintética), así como la clasificación taxonómica con las bases de datos de RDP y UNITE, respectivamente para bacterias y hongos. Además, se llevaron a cabo análisis de diversidad microbiana tanto en términos de diversidad y riqueza (diversidad  $\alpha$ ) como de la estructura de la comunidad (diversidad  $\beta$ ). Por otro lado, se estudió el perfil taxonómico de las fincas tanto a nivel de phylum como de género y se estudiaron aquellos taxones que presentaron diferencias estadísticamente significativas en su abundancia relativa utilizando la herramienta ANCOM-BC, implementada en la función *ancomloop* de Micro4all. Para complementar los estudios sobre diversidad y estructura, se trataron de inferir las potenciales funciones metabólicas o tróficas de las comunidades bacterianas y fúngicas, para lo que se utilizaron las herramientas FAPROTAX y FungalTraits, respectivamente. Por último, se analizaron las redes de coocurrencia entre bacterias y hongos mediante la herramienta MENAP. Además de los análisis de las secuencias obtenidas, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa para la aproximación de la biomasa microbiana en la rizosfera, determinada como el número de copias por gramo de suelo de los genes *16S rRNA* y *18S rRNA*.

### III.3. RESULTADOS

#### III.3.1. Efecto del manejo agrícola en el suelo: parámetros fisicoquímicos y biomasa microbiana.

##### III.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo.

Los suelos estudiados mostraron las mismas características en términos de composición. Ambas fincas se establecían en suelos arcillosos, con un porcentaje de arcilla que variaba entre el 60,40% y el 66,40%. Si bien el pH fue similar en ambos suelos, independientemente del manejo implementado, el contenido en nutrientes difirió claramente entre condiciones. Como era de esperar, el suelo OM fue más rico que el

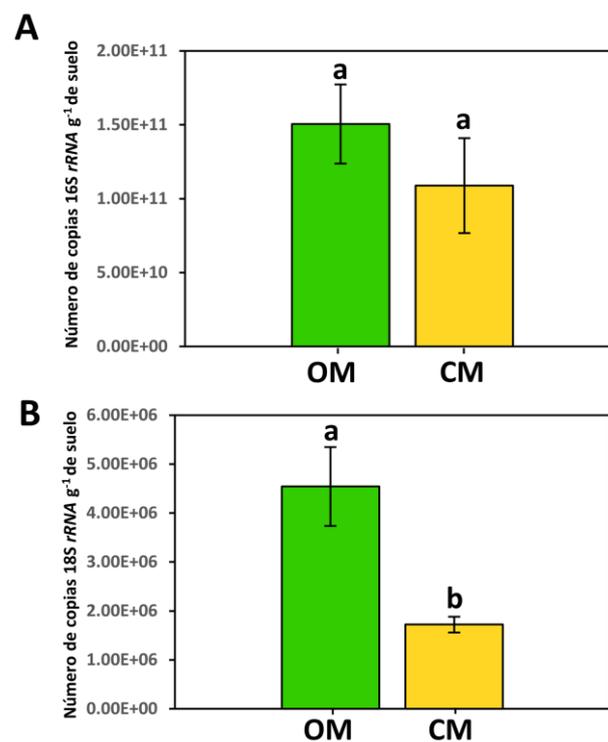
suelo CM en términos de contenido de nutrientes. De hecho, la materia orgánica oxidable, el nitrógeno total, el potasio asimilable, el nitrato, el sulfato y el bicarbonato fueron significativamente más abundantes en el suelo OM (según una prueba t de Student,  $P < 0,05$ ). El fósforo asimilable también fue más abundante en OM, pero no se pudo utilizar ninguna prueba estadística ya que su concentración estaba por debajo del límite de detección en dos de las tres muestras de suelo suelto analizadas. Finalmente, la conductividad del suelo también fue estadísticamente mayor en OM (prueba t de Student,  $P < 0,05$ ). Ninguno de los 516 fitosanitarios medidos fue detectable en las muestras, ni en OM ni en CM (Tabla M2). Los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del suelo se muestran en la Tabla III.1.

**Tabla III.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo.** Los parámetros fisicoquímicos del suelo se muestran como el valor medio y su desviación estándar. Los valores en negrita indican diferencias significativas según una t de Student ( $P < 0,05$ ).

	OM	CM
Arcilla (%)	60,40 ± 1,79	66,40 ± 2,85
Arena (%)	21,63 ± 3,20	19,40 ± 2,92
Limo (%)	17,97 ± 1,73	14,20 ± 0,20
pH	8,39 ± 0,03	8,54 ± 0,10
<b>Salinidad (µS/cm)</b>	<b>4070,0 ± 88,9*</b>	<b>897,7 ± 239,3*</b>
<b>Materia orgánica oxidable (%)</b>	<b>2,75 ± 0,13*</b>	<b>1,13 ± 0,44*</b>
<b>Nitrógeno total (%)</b>	<b>0,20 ± 0,04*</b>	<b>0,11 ± 0,01*</b>
C/N (%)	8,50 ± 1,42	5,54 ± 2,05
<b>K asimilable (mg/Kg)</b>	<b>1789,6 ± 244,2*</b>	<b>332,4 ± 114,3*</b>
P asimilable (mg/Kg)	121,7 ± 34,7	< 4
<b>Nitrato (mg/L)</b>	<b>878,7 ± 147,7*</b>	<b>163,7 ± 147,2*</b>
<b>Sulfato (mg/L)</b>	<b>889,7 ± 259,7*</b>	<b>111,7 ± 20,8*</b>
<b>Bicarbonato (mg/L)</b>	<b>206,0 ± 13,7*</b>	<b>121,7 ± 17,6*</b>

### III.3.1.2. Biomasa microbiana de la rizosfera.

La biomasa bacteriana y fúngica presente en la rizosfera de ambas fincas se midió según el número de copias de los genes *16S rRNA* y *18S rRNA* por gramo de suelo mediante PCR cuantitativa (qPCR). En la rizosfera de árboles sometidos a manejo orgánico, el número de copias de ambos genes fue mayor en comparación a lo obtenido en el suelo con manejo convencional. Como se puede apreciar en la Figura III.1, el número de copias del gen *16S rRNA* alcanzó un valor de  $1,5 \times 10^{11} \pm 2,68 \times 10^{10}$  copias por gramo de suelo en OM en contraposición a las  $1,09 \times 10^{11} \pm 3,21 \times 10^{10}$  copias por gramo de suelo obtenidas en CM. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa según una prueba t de Student ( $P = 0,38$ ). En cambio, las diferencias encontradas en el número de copias del gen *18S rRNA* si fueron estadísticamente significativas ( $P = 0,01$ ), con un valor de  $4,54 \times 10^6 \pm 8,07 \times 10^5$  copias por gramo de suelo en OM, mientras que los valores para el suelo de CM se mantuvieron en  $1,72 \times 10^6 \pm 1,62 \times 10^5$ .



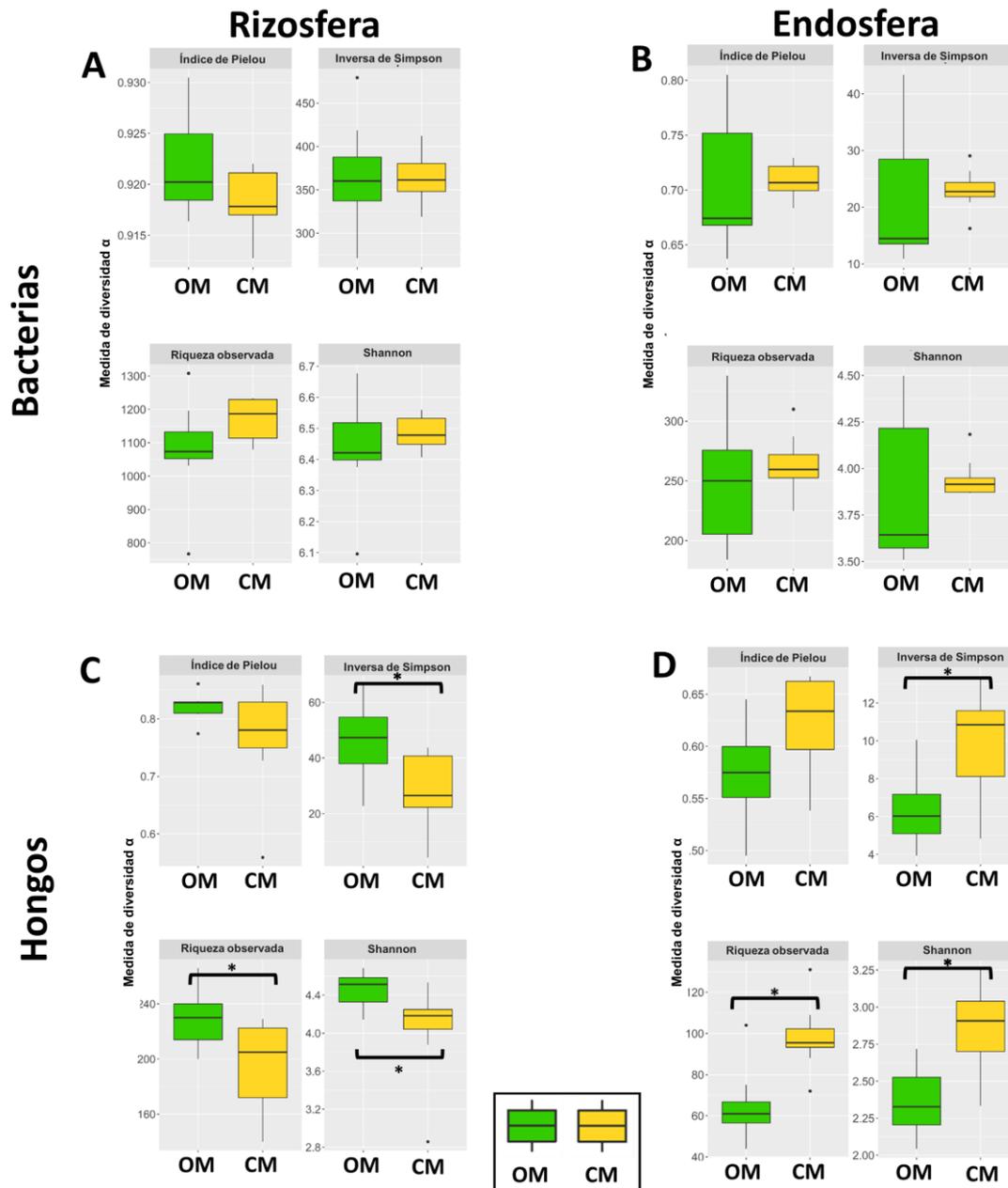
**Figura III.1. Biomasa bacteriana y fúngica en la rizosfera.** Se muestra el número de copias por gramo de suelo del gen *16S rRNA* (panel A) y del gen *18S rRNA* (panel B). Los valores con diferencias estadísticamente significativas a un nivel de significación del 5% (según una t de Student) se muestran con letras diferentes.

### **III.3.2. Características generales de los datos de secuenciación.**

El número total de lecturas brutas obtenidas para los conjuntos de datos bacterianos y fúngicos fue de 4.567.342 y 4.899.001, respectivamente. Después del filtrado de calidad y la inferencia de ASVs, se retuvieron 2.909.036 secuencias bacterianas y 3.136.396 secuencias fúngicas. Las secuencias de buena calidad representaron un mínimo de 44.111 y un máximo de 100.161 por muestra en el conjunto de datos procariontes; y 25.157 y 145.551 secuencias en el conjunto de datos fúngicos. Finalmente, se analizó la comunidad sintética (comunidad MOCK) que fue secuenciada por triplicado para cada librería y se descartaron los ASVs que representaron menos del 0,002 % de las lecturas bacterianas y fúngicas, respectivamente. Esto resultó en un número final de 3.997 ASVs bacterianos y 1.650 ASVs fúngicos que se utilizaron en análisis posteriores.

### **III.3.3. La enmienda de estiércol de oveja afectó diferencialmente a las comunidades bacterianas y fúngicas.**

La diversidad y riqueza (diversidad  $\alpha$ ), medida como riqueza observada, índices de Shannon e inversa de Simpson, mostraron diferencias estadísticamente significativas solo en la comunidad fúngica de las raíces (tanto en la rizosfera como en la endosfera), según la prueba de Wilcoxon (Figura III.2). Además, las diferencias en la diversidad  $\alpha$  pueden explicarse debido a una variación en la riqueza observada, ya que la comparación del índice de Pielou no fue estadísticamente significativa. En contraste, la diversidad  $\alpha$  bacteriana de las raíces no mostró diferencias ni en la rizosfera ni en la endosfera.



**Figura III.2.** Índices de diversidad  $\alpha$  para la comunidad bacteriana (paneles A y B) y fúngica (paneles C y D) en cada tratamiento y microhábitat (paneles A y C, rizosfera; B y D, endosfera radicular). En cada índice, se muestran cinco estadísticos: la mediana, dos percentiles (al 25 y al 75) y los valores máximos y mínimos. Los puntos indican valores atípicos. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a una prueba de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ). OM: manejo orgánico, CM: manejo convencional).

A pesar de los resultados observados en la diversidad  $\alpha$ , la estructura de la comunidad (diversidad  $\beta$ ) difirió en ambos microhábitats (rizosfera y endosfera de las

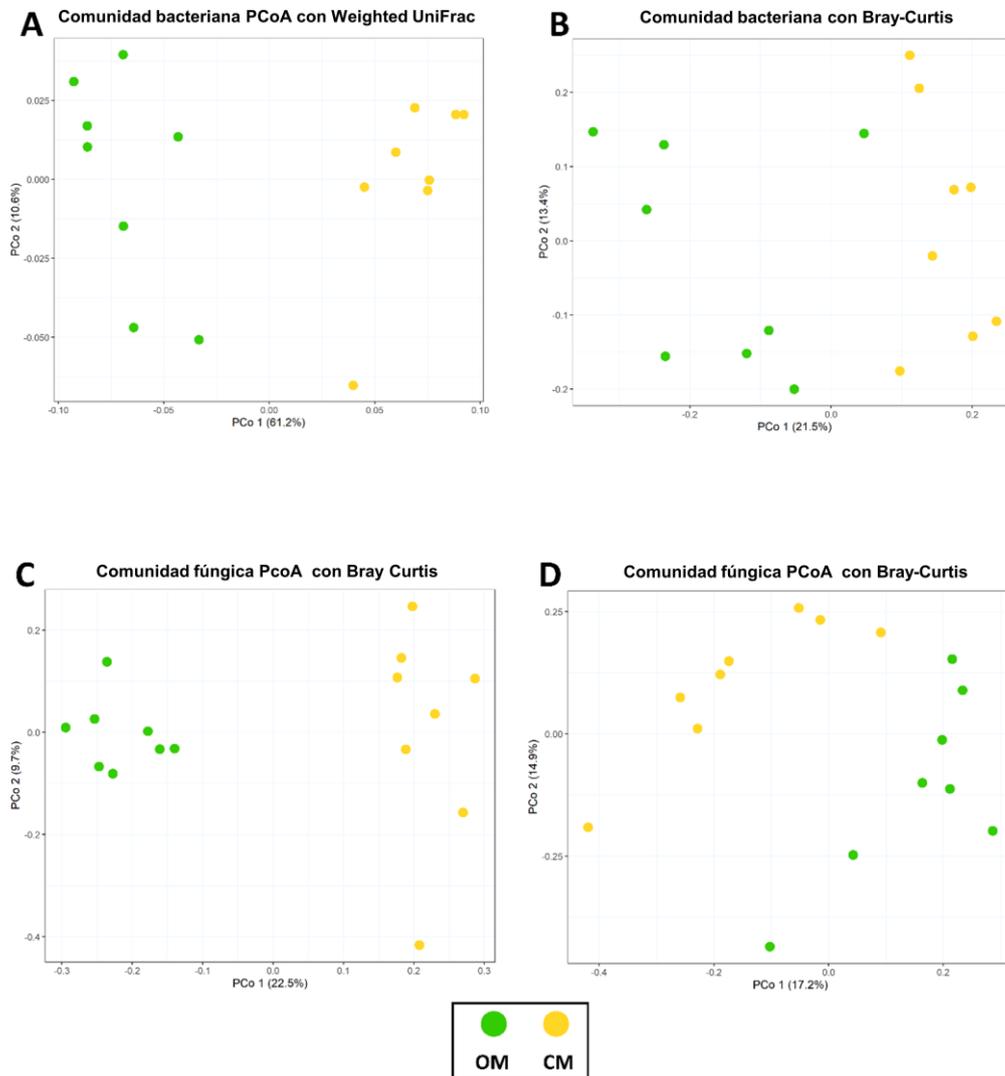
raíces) y en ambos dominios (bacterias y hongos). Específicamente, una prueba PERMANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los manejos (OM frente a CM) para todos los análisis (Tabla III.2). Para evaluar la homocedasticidad (dispersión de la varianza) de los tratamientos, se realizó una prueba BETADISPER, resultando en una ausencia de significación en las diferencias de varianza, excepto para la rizosfera de la comunidad fúngica. Sin embargo, la representación gráfica mostró una separación marcada entre las comunidades fúngicas de OM y CM en este compartimento (Figura III.3). Por lo tanto, podemos afirmar con certeza que en todos los casos, la enmienda con estiércol tuvo un efecto en la estructura de la comunidad microbiana de la raíz de los olivos estudiados.

**Tabla III.2. Valores de p obtenidos en el análisis de diversidad  $\beta$ .** Se muestran los valores de p para una prueba PERMANOVA realizada sobre datos de comunidades microbianas de rizosfera y endosfera, comparando entre diferentes manejos agrícolas. También se muestra el valor del R<sup>2</sup> obtenido en esta prueba estadística, así como el valor de p de la prueba de homogeneidad de varianzas multivariante (BETADISPERSION). Los valores en negrita y cursiva corresponden con valores de p estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ).

Comparación	Compartimento	Valor de p PERMANOVA		R <sup>2</sup> PERMANOVA		Valor de p BETADISPERSION	
		Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos
Manejo agrícola (OM vs CM)	Rizosfera	<b><i>0,001<sup>1</sup></i></b>	<b><i>0,001<sup>2</sup></i></b>	0,57	0,22	0,89	<b><i>0,002</i></b>
	Endosfera	<b><i>0,001<sup>2</sup></i></b>	<b><i>0,001<sup>2</sup></i></b>	0,18	0,15	0,31	0,66

<sup>1</sup> Basado en distancias Weighted UniFrac

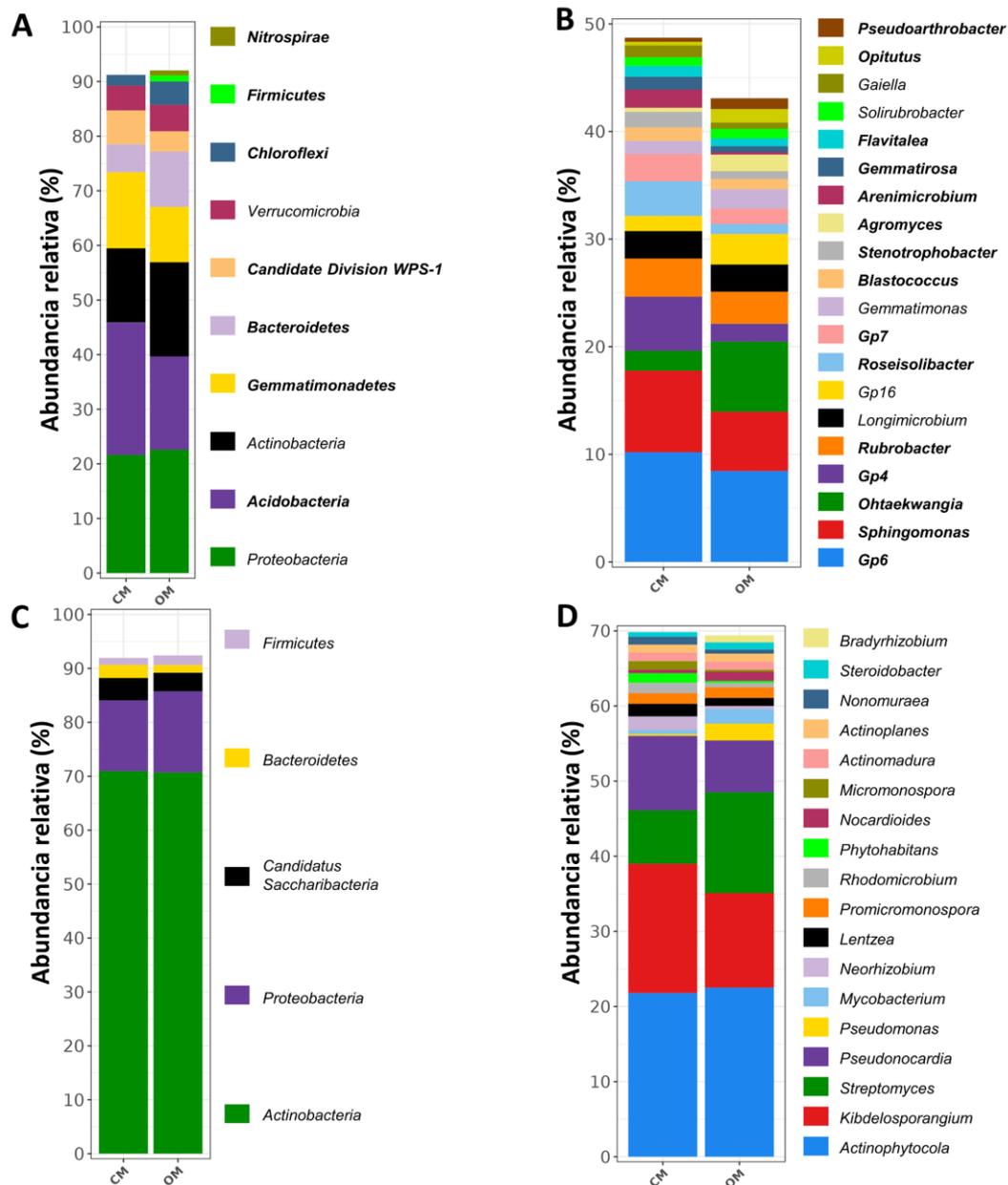
<sup>2</sup> Basado en disimilitudes Bray-Curtis



**Figura III.3. Análisis de Coodenadas Principales (PCoA) de la comunidad microbiana.** En la parte superior de la figura, se muestran los PCoA de las comunidades bacterianas (A: rizosfera, B: endosfera radicular) calculado con distancias Weighted UniFrac y disimilitudes Bray-Curtis, respectivamente. En la parte inferior, se muestran los PCoA de las comunidades fúngicas (C: rizosfera, D: endosfera radicular) calculados con disimilitudes Bray-Curtis.

### III.3.4. Influencia del manejo del suelo en el perfil taxonómico de la rizosfera de olivo.

El perfil taxonómico bacteriano a nivel de phylum en la rizosfera estuvo dominado por *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes* y la *candidate division WPS-1* (Figura III.4). Estos phyla representaron al menos el 80,91 % de las secuencias. Entre los phyla que representaban al menos el 0,9 % del total de secuencias, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *candidate division WPS-1* fueron significativamente más abundantes en CM, mientras que *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* y *Nitrospirae* predominaron en OM. A nivel de género, la comunidad estuvo dominada por miembros de los géneros *Gp6*, *Sphingomonas*, *Ohtaekwangia*, *Gp4* y *Rubrobacter* (Figura III.4). Entre los géneros con diferencias estadísticamente significativas, se analizaron en detalle los 20 más abundantes. En este sentido, *Gp6*, *Sphingomonas*, *Gp4*, *Rubrobacter*, *Roseisolibacter*, *Gp7*, *Blastococcus*, *Stenotrophobacter*, *Arenimicrobium*, *Gemmatirosa*, *Flavitalea*, *Flavisolibacter*, *Ramlibacter* y *Actinomarinicola* fueron relativamente más abundantes en CM, mientras que *Ohtaekwangia*, *Agromyces*, *Opiritutus*, *Pseudoartrobacter*, *Nitrospira* y *Nocardioides* fueron relativamente más abundantes en la rizosfera de los árboles de OM.

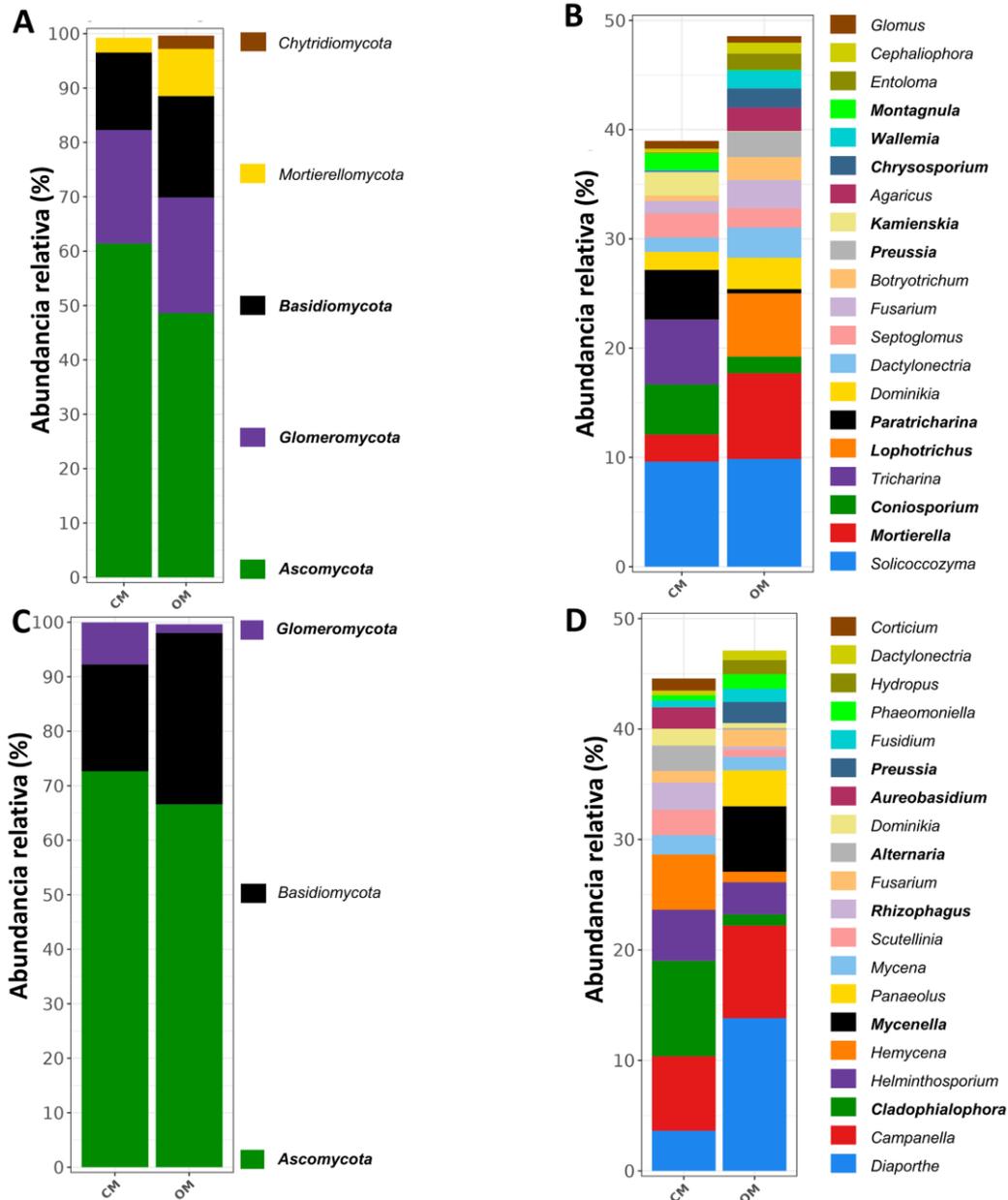


**Figura III.4.** Perfil de composición bacteriana en la rizosfera y endosfera radicular. Se muestra el perfil bacteriano a nivel de phylum (paneles A y C) y de género (paneles B y D) tanto en la rizosfera (parte superior de la figura) como en la endosfera radicular (parte inferior de la figura). Solo se muestran los taxones con una abundancia relativa mayor al 0,9 % en alguna de las condiciones. Las letras en negrita muestran aquellos taxones con diferencias estadísticamente significativas según una prueba de ANCOM-BC ( $P < 0,05$ ).

En cuanto a la comunidad fúngica, los phyla *Ascomycota*, *Glomeromycota* y *Basidiomycota* fueron los más abundantes, representando al menos el 88,52 % de las secuencias (Figura III.5). Además, *Basidiomycota* y *Ascomycota* mostraron abundancias

relativas significativamente mayores en CM, mientras que *Glomeromycota* fue relativamente más abundante en la rizosfera de los árboles de OM.

Los perfiles taxonómicos fúngicos a nivel de género variaron considerablemente entre los diferentes manejos agrícolas (Figura III.5). Sin embargo, *Solicoccozyma* fue el género más abundante en ambas condiciones, representando el 9,86 % (OM) y el 9,60 % (CM) de las secuencias. Otros géneros relevantes en términos de abundancia relativa fueron *Mortierella* (7,85%) y *Lophotricus* (5,78%) para OM, y *Tricharina* (5,92%) y *Coniosporium* (4,59%) para CM. Entre los géneros con diferencias estadísticamente significativas, los 20 más abundantes fueron *Coniosporium*, *Paratracharina*, *Kamienskia*, *Montagnula* y *Bradomyces* (más abundantes en CM), y *Mortierella*, *Lophotricus*, *Preussia*, *Chrysosporium*, *Wallemia*, *Heydenia*, *Phyloctochytrium*, *Ajellomyces*, *Plectosphaerella*, *Scopulariopsis*, *Coniochaeta*, *Volutella*, *Stagnosporopsis*, *Diaporthe* y *Monodictys* (más abundantes en OM).



**Figura III.5. Perfil de composición fúngica en la rizosfera y endosfera radicular.** Se muestra el perfil fúngico a nivel de phylum (paneles A y C) y de género (paneles B y D) tanto en la rizosfera (parte superior de la figura) como en la endosfera radicular (parte inferior de la figura). Solo se muestran los taxones con una abundancia relativa mayor al 0,9 % en alguna de las condiciones. Las letras en negrita se refieren a aquellos taxones con diferencias estadísticamente significativas según un test de ANCOM-BC ( $P < 0,05$ ).

### III.3.5. *Actinobacteria* y *Ascomycota*: taxones principales en el perfil taxonómico de la endosfera.

Es interesante destacar que en la endosfera las comunidades bacterianas y la fúngicas estuvieron dominadas por un phylum mayoritario. En el caso de bacterias, este fue *Actinobacteria*, que representó una abundancia relativa del 70,72 % en OM y del 70,96 % en CM. Por su parte, la comunidad fúngica estuvo dominada por *Ascomycota*, que supuso un 66,57 % y un 72,63 % de las secuencias en OM y CM, respectivamente (Figura III.4 y Figura III.5).

En contraposición a lo encontrado en la rizosfera, no se hallaron un gran número de phyla con diferencias estadísticamente significativas en sus abundancias relativas. De hecho, sólo los phyla con abundancias relativas menores al 0,9 % presentaron diferencias significativas, en concreto, *Gemmatimonas*. La comunidad fúngica sí mostró diferencias en dos de los phyla más abundantes (ANCOM-BC,  $P < 0,05$ ), en concreto, *Ascomycota* y *Glomeromycota*, ambos más abundantes en CM.

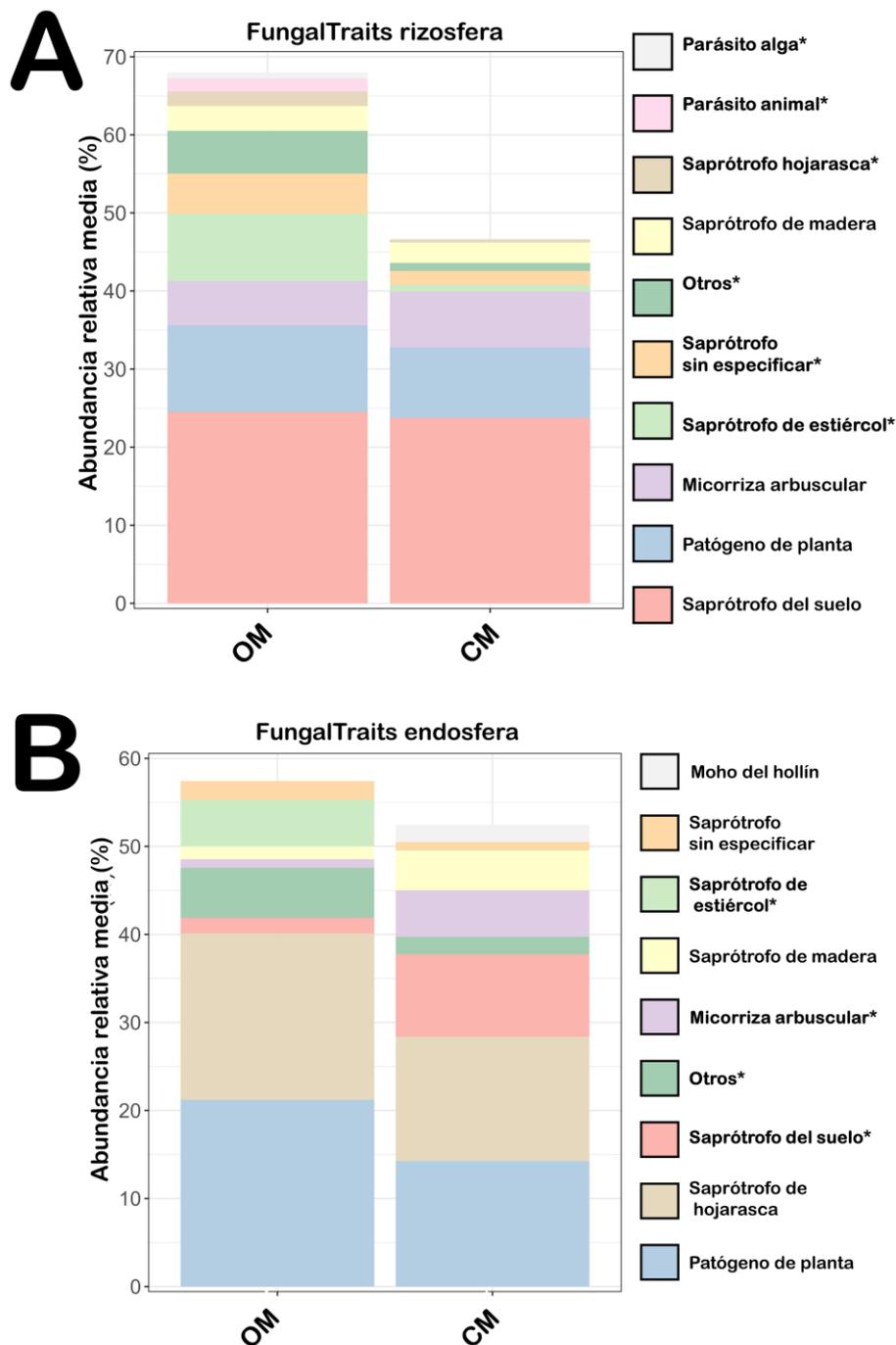
El perfil taxonómico a nivel de género mostró cuatro géneros del phylum *Actinobacteria* como los más abundantes en la comunidad bacteriana (Figura III.4). Estos fueron *Actinophytocola*, *Kibdelosporangium*, *Streptomyces* y *Pseudonocardia*, que representaron al menos un 55,41 % de las secuencias. De manera destacable, *Actinophytocola* representó por sí solo un 22,51 % (OM) y un 21,79% de las secuencias (CM). En la comunidad fúngica, el género más abundante fue *Diaporthe* (del phylum *Ascomycota*), representando una abundancia relativa del 13,82 % (OM) y del 3,63 % de las secuencias (CM) (Figura III.5).

En cuanto a los géneros con diferencias estadísticamente significativas, en el caso de la comunidad bacteriana solo se vieron afectados géneros con abundancias relativas menores al 0,9 %, mientras que en el caso de hongos se encontraron diferencias significativas para seis géneros, siendo *Preussia*, *Mycenella* y *Cladophialophora* significativamente más abundantes en OM, *Aureobasidium*, *Rhizophagus* y *Alternaria* más abundantes en CM.

### III.3.6. Grupos funcionales fúngicos.

Para ambos compartimentos analizados, solo se consideraron aquellos grupos funcionales con una abundancia relativa superior al 0,7 %. En la rizosfera, los grupos funcionales más abundantes fueron saprófitos del suelo, patógenos de plantas, saprófitos de estiércol y micorrizas arbusculares. Como punto a destacar, los estilos de vida primarios relacionados con la degradación de la materia orgánica aumentaron significativamente en OM, como los saprófitos de estiércol, saprófitos no especificados y saprófitos de hojarasca. Los parásitos de animales también fueron significativamente más abundantes en OM (Figura III.6).

En la endosfera, los grupos funcionales más abundantes correspondieron a patógenos de plantas, saprófitos de hojarasca, saprófitos del suelo, saprófitos de estiércol y micorrizas arbusculares. Siguiendo los resultados de la rizosfera, los saprófitos de estiércol fueron significativamente más abundantes en OM. Además, las micorrizas arbusculares se incrementaron significativamente en CM (Figura III.6).



**Figura III.6. Resultado de FungalTraits para rizosfera y endosfera.** Se calcularon las abundancias relativas de los grupos funcionales fúngicos para la rizosfera (A) y la endosfera (B) en ambas condiciones (OM y CM) utilizando la herramienta FungalTraits. Las letras en negrita y con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas según una prueba de Wilcoxon con corrección de FDR de Benjamini-Hochberg ( $P < 0,05$ ). OM: manejo orgánico, CM: manejo convencional.

### III.3.7. Inferencia de funciones metabólicas.

Mediante la utilización de la herramienta FAPROTAX, se consiguió la asignación de funciones metabólicas para el 37 % y el 87 % de los ASVs totales en la rizosfera y endosfera, respectivamente. En general, las funciones más abundantes fueron aquellas relacionadas con el ciclo del carbono como la quimioheterotrofia y la quimioheterotrofia aeróbica (Tabla III.3 y Tabla III.4). Por otra parte, tanto para la endosfera como para la rizosfera, las funciones relacionadas con degradación de compuestos recalcitrantes fueron estadísticamente más abundantes en OM respecto a CM (según una prueba de Mann Whitney-Wilcoxon,  $P < 0,05$ ). Dentro de estas funciones destacaron la degradación de compuestos aromáticos, hidrocarburos e hidrocarburos aromáticos y de hidrocarburos alifáticos diferentes del metano. Estas funciones se vieron relacionadas principalmente con los géneros *Rhodococcus* y *Nocardioides*, así como con miembros de la familia *Methylocystaceae*.

Las funciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno fueron de interés por su aumento significativo en OM en ambos microhábitats. De esta manera, en la rizosfera de los olivos OM se vio favorecida la nitrificación, observándose un aumento de funciones como la nitrificación, oxidación aeróbica del amonio y oxidación aeróbica de nitrito. Además, la ureolisis también aumentó en la rizosfera de OM. Paralelamente, la desnitrificación se vio aumentada en la endosfera de OM, con funciones como la reducción de nitrato, respiración de nitrato y respiración de nitrógeno. Por último, la quitinolisis también se vio potenciada en la rizosfera de OM.

**Tabla III.3. Potenciales funciones metabólicas predichas por FAPROTAX en la rizosfera.** Solo se muestran las funciones con una abundancia mayor al 0,1 %. Los principales taxones implicados se muestran como aquellos 10 más abundantes. Los valores en negrita y con asterisco muestran diferencias estadísticamente significativas según una prueba de Wilcoxon con corrección según Benjamini-Hochberg FDR.

Funciones metabólicas rizosfera	OM	CM	Taxones implicados
<b>Ciclo del carbono</b>			
Quimioheterotrofia	<b>16,28*</b>	<b>14,50</b>	<i>Methylocystaceae</i> no clasificada, <i>Sphingomonas</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Solirubrobacter</i> , <i>Opitutus</i> , <i>Lysobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioides</i>
Quimioheterotrofia aeróbica	14,44	13,99	<i>Erythrobacteraceae</i> no clasificado, <i>Sphingomonas</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Solirubrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Microvirga</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Opitutus</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Lautropia</i> , <i>Isptericola</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Geothrix</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Olsenella</i> , <i>Streptococcus</i>
Fermentación	<b>1,04*</b>	<b>0,28</b>	<i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardioides</i>
Degradación de compuestos aromáticos	<b>0,58*</b>	<b>0,17</b>	<i>Rhodococcus</i> ,
Degradación de hidrocarburos	<b>0,15*</b>	<b>0,01</b>	<i>Methylocystaceae</i> no clasificado <i>Blastochloris</i> ,
Fototrofia	<b>0,20*</b>	<b>0,15</b>	<i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , <i>Craurococcus</i> ,

			<i>Ectothiorhodospiraceae</i> no clasificado
Fotoautotrofia	0,18*	0,09	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> no clasificado
Fotoautotrofia anoxigénica	0,18*	0,09	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> no clasificado
Degradación de hidrocarburos aromáticos	0,11*	0,00	<i>Rhodococcus</i>
Degradación de hidrocarburos no metánicos	0,11*	0,00	<i>Rhodococcus</i>
Metilotrofia	0,13*	0,03	<i>Methanomassiliicoccus</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Methylocystaceae</i> no clasificado, <i>Paracoccus</i> , <i>Methylobacillus</i> , <i>Methylophilus</i> , <i>Methylotenera</i>
<b>Ciclos del carbono y del nitrógeno</b>			
Quitinólisis	0,60*	0,19	<i>Lysobacter</i>
Ureólisis	0,46*	0,17	<i>Afipia</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Roseomonas</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Massilia</i> , <i>Methylophilus</i>
<b>Ciclo del nitrógeno</b>			
Reducción de nitrato	3,45	3,17	<i>Rubrobacter</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Craurococcus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Opitutus</i>
Nitrificación	1,02*	0,28	<i>Nitrososphaera</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrosospira</i>
Oxidación aeróbica del nitrito	0,74*	0,18	<i>Nitrospira</i> , <i>Nitrobacter</i>
Oxidación aerobia del amonio	0,28*	0,09	<i>Nitrososphaera</i> , <i>Nitrosospira</i>
Fijación de nitrógeno	0,22	0,30	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Azospirillum</i>
<b>Ciclo del azufre</b>			

Fotoautotrofía oxidadora de azufre	<b>0,18*</b>	<b>0,05</b>	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> no clasificado
<b>Otros</b>			
Oxidación de manganeso	<b>0,11*</b>	<b>0,24</b>	<i>Geodermatophilus</i>
No asignadas	57,93	64,24	

**Tabla III.4. Potenciales funciones metabólicas predichas por FAPROTAX en la endosfera radicular.** Solo se muestran las funciones con una abundancia mayor al 0,1 %. Los principales taxones implicados se muestran como aquellos 10 más abundantes. Los valores en negrita y con asterisco muestran diferencias estadísticamente significativas según una prueba de Wilcoxon con corrección según Benjamini-Hochberg FDR.

Funciones metabólicas endosfera	OM	CM	Taxones implicados
<b>Ciclo del carbono</b>			
Quimioheterotrofía	<b>40,37*</b>	<b>38,14</b>	<i>Methylocystaceae</i> no clasificado, <i>Sphingomonas</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Solirubrobacter</i> , <i>Opitutus</i> , <i>Lysobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioides</i>
Quimioheterotrofía aeróbica	40,07	37,75	<i>Erythrobacteraceae</i> no clasificado, <i>Sphingomonas</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Solirubrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Microvirga</i> , <i>Mesorhizobium</i> <i>Opitutus</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> ,
Fermentación	0,33	0,21	<i>Lautropia</i> , <i>Isptericola</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Geothrix</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Olsenella</i> , <i>Streptococcus</i>
Degradación de compuestos aromáticos	0,61	0,34	<i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardioides</i>

Degradación de hidrocarburos	0,11	0,20	<i>Rhodococcus, Methylocystaceae no clasificado</i>
			<i>Methanomassiliicoccus,</i>
			<i>Methylobacterium,</i>
Metilotrofia	0,08	0,20	<i>Methylocystaceae no clasificado,</i>
			<i>Paracoccus, Methylobacillus,</i>
			<i>Methylophilus, Methylothermobacter</i>
Metanotrofia	0,02	0,20	<i>Methylocystaceae no clasificado</i>
<b>Ciclos del carbono y del nitrógeno</b>			
			<i>Afipia, Methylobacterium,</i>
Ureolisis	0,30	0,60	<i>Mesorhizobium, Roseomonas,</i>
			<i>Azospirillum, Massilia,</i>
			<i>Methylophilus</i>
Ciclo del nitrógeno			
Fijación de nitrógeno	0,48	0,68	<i>Bradyrhizobium, Azospirillum</i>
			<i>Rubrobacter, Nitrobacter,</i>
			<i>Sinorhizobium, Paracoccus,</i>
Reducción de nitrato	<b>0,28*</b>	<b>0,04</b>	<i>Achromobacter,</i>
			<i>Escherichia/Shigella, Klebsiella,</i>
			<i>Stenotrophomonas, Opitutus</i>
Respiración de nitrato	<b>0,18*</b>	<b>0,00</b>	<i>Nitrobacter, Paracoccus,</i>
			<i>Achromobacter, Stenotrophomonas</i>
Respiración de nitrógeno	<b>0,18*</b>	<b>0,00</b>	<i>Nitrobacter, Paracoccus,</i>
			<i>Achromobacter, Stenotrophomonas</i>
<b>Parásitos</b>			
			<i>Prevotella, Afipia, Roseomonas,</i>
Parásitos animales o simbioses	<b>0,11*</b>	<b>0,24</b>	<i>Citrobacter, Escherichia/Shigella,</i>
			<i>Coxiella, Stenotrophomonas</i>
			<i>Afipia, Roseomonas, Citrobacter,</i>
Asociados a humanos	<b>0,14</b>	<b>0,22*</b>	<i>Escherichia/Shigella, Coxiella,</i>
			<i>Stenotrophomonas</i>

Patógenos humanos	0,08	0,22*	<i>Afipia, Roseomonas,</i> <i>Escherichia/Shigella, Coxiella,</i> <i>Stenotrophomonas</i>
No asignadas	14,39	12,13	

### III.3.8. Efectos opuestos del manejo del suelo en las redes de coocurrencia en ambos compartimentos.

Las redes de coocurrencia microbiana se calcularon y analizaron para cada finca (OM y CM), así como para cada microhábitat (rizosfera y endosfera). En general, se observó un cambio en las características de la red entre manejos, aunque la respuesta fue diferente para rizosfera y endosfera. Más específicamente, la red de la rizosfera en OM fue más compleja en comparación a CM, presentando un mayor número de conexiones, conectividad media (*avgK*) y coeficiente de agrupamiento (*avgCC*) (Tabla III.5). Además, la modularidad y el número de módulos fueron menores en OM y el porcentaje de interacciones positivas fue mayor en la rizosfera de OM. Sin embargo, el patrón opuesto se observó en la endosfera, con una red menos compleja para la finca con manejo orgánico con una mayor modularidad y un menor porcentaje de interacciones positivas.

**Tabla III.5. Principales propiedades topológicas de las redes de coocurrencia.** Los valores estaísticamente significativos entre condiciones se marcan en negrita con asteriscos ( $P < 0,05$ ). avgK: conectividad media, avgCC: coeficiente de agrupamiento, GD: distancia geodésica media, PEP: porcentaje de interacciones positivas.

	OM rizosfera	CM rizosfera	OM endosfera	CM endosfera
N. original ASVs	1268	1333	226	322
Umbral de similitud (St)	0,92	0,93	0,85	0,87
Nodos totales	871	835	173	257
Conexiones totales	2047	1887	239	705
R <sup>2</sup> de la Ley Potencial	0,8	0,83	0,74	0,74
avgK	4,7	4,5	2,76	5,49
avgCC	<b>0,10*</b>	<b>0,08*</b>	<b>0,04*</b>	<b>0,17*</b>
GD	<b>7,51*</b>	<b>7,81*</b>	<b>6,79*</b>	<b>7,08*</b>
Modularidad (nº de módulos)	<b>0,82 (74) *</b>	<b>0,90 (89) *</b>	<b>0,77 (21) *</b>	<b>0,59 (25) *</b>
PEP	55,30%	33,70%	31,80%	64,40%

### III.4. DISCUSIÓN

Existe bastante evidencia sobre el impacto que las enmiendas orgánicas tienen sobre las propiedades del suelo (por ejemplo, mejorando los niveles de nutrientes y de retención de agua), influyendo así en la comunidad microbiana del suelo, la rizosfera y la endosfera de la raíz (Chernov & Semenov, 2021; French et al., 2021; S. T. Lucas et al., 2014). En este estudio, nos propusimos evaluar el efecto de dos prácticas agronómicas diferentes sobre el microbioma radicular de olivos de la variedad picual. En concreto, evaluamos un manejo orgánico (con enmienda orgánica de estiércol de oveja) y un manejo convencional. Las dos fincas estudiadas eran adyacentes, por lo que las condiciones ambientales y edáficas eran similares, reduciendo la variabilidad en este

sentido. De hecho, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de arcilla, arena y limo. Sin embargo, el aporte de estiércol modificó considerablemente la composición en nutrientes del suelo, como lo demuestran los incrementos observados en materia orgánica oxidable, nitratos, nitrógeno total y fósforo. Aunque las concentraciones de sulfato y potasio también aumentaron, esto podría deberse a la enmienda con un fertilizante ecológico inorgánico aplicada en la finca OM. Resulta destacable que los niveles de nitratos y nitrógeno total fueron superiores en esta finca, a pesar de que en la finca CM se aplicó sulfato amónico al suelo. Debido a los cambios en el contenido de nutrientes, es esperable observar variaciones en la comunidad microbiana. De hecho, se observó un incremento en la diversidad microbiana y un cambio en la estructura de la comunidad en ambos compartimentos radiculares estudiados. Sin embargo, el efecto sobre la diversidad  $\alpha$  sólo se observó en la comunidad fúngica, mientras que la diversidad y la riqueza del bacterioma permanecieron prácticamente inalteradas. Esto concuerda con estudios previos sobre plantas herbáceas sometidas a diferentes manejos (Laconi et al., 2021; H. Li et al., 2021; Qiao et al., 2019; Windisch et al., 2021; X. Wu et al., 2022). De hecho, un mayor efecto sobre la diversidad fúngica puede estar relacionado con diferencias en el contenido de materia orgánica del suelo (R. Sun et al., 2016), lo que se encuentra en consonancia con nuestros resultados.

Aunque la biomasa microbiana del suelo se ha estudiado en olivares (Moreno et al., 2009), poco se sabe sobre el efecto de enmiendas orgánicas en la biomasa microbiana de la rizosfera del olivo. Este aspecto es de interés debido a las implicaciones potenciales en la nutrición de la planta. Nuestros resultados mostraron que la biomasa microbiana aumentó en la rizosfera de los árboles muestreados en la finca OM, aunque sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la comunidad fúngica. Varios estudios han mostrado aumentos en la biomasa microbiana asociados al uso de enmiendas orgánicas, tanto a largo como a corto plazo (Das et al., 2017; J. Li et al., 2015; Luan et al., 2020; Qi et al., 2016; Q. C. Zhang et al., 2012). Además, el hecho de que encontremos un mayor impacto sobre la biomasa fúngica podría verse relacionado con los resultados anteriormente citados sobre la diversidad de la comunidad y el contenido de carbono del suelo. Por tanto, los olivos podrían

beneficiarse de este tipo de enmiendas por el aumento de la disponibilidad de nutrientes del suelo, la diversidad microbiana y la biomasa (Pii et al., 2015). Estos resultados, si bien apoyan estudios previos realizados en plantas herbáceas (H. Li et al., 2021; Qiao et al., 2019; Windisch et al., 2021; X. Wu et al., 2022), sientan un precedente en plantas leñosas, en las que aún no se había estudiado el efecto de la enmienda con estiércol sobre la biomasa de las comunidades microbianas de la raíz.

Las diferencias observadas en la estructura de la comunidad microbiana y en la biomasa microbiana se reflejaron en los perfiles taxonómicos. Así, determinados phyla y géneros aumentaron o disminuyeron su abundancia relativa en función al manejo del suelo aplicado en la finca. En cuanto a la comunidad bacteriana, las acidobacterias fueron considerablemente más abundantes en la rizosfera de los olivos sometidos a un manejo convencional. Los miembros de este phylum se consideran oligótrofos de crecimiento lento (Francioli et al., 2016), por lo que su abundancia relativa se suele ver aumentada en suelos pobres en nutrientes. Aunque la finca CM recibió un régimen de fertilizantes convencionales, nuestro análisis mostró un mayor contenido de nutrientes en la finca OM, lo que podría relacionarse con la disminución de la abundancia relativa de este phylum. Del mismo modo, *Gemmatimonadetes* también resultó ser más abundante en la rizosfera CM. Este phylum se ha detectado en una amplia variedad de suelos, pero su presencia parece estar relacionada con la retención de agua, siendo más abundante en suelos secos (DeBruyn et al., 2011). Dado que las enmiendas de estiércol pueden aumentar el contenido de agua en el suelo mejorando su estructura, su uso puede disminuir la abundancia de los miembros de este phylum. Por el contrario, los miembros de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* fueron más abundantes en la finca OM. Ambos phyla suelen estar presentes en la materia fecal, por lo que su abundancia puede estar relacionada con la aplicación de estiércol (Francioli et al., 2016; S. Zhang et al., 2020). Además, podrían verse afectados por el mayor contenido de carbono de la finca OM. De hecho, los miembros de *Firmicutes* se consideran bacterias copiotróficas (Francioli et al., 2016). En cuanto a los miembros del phylum *Bacteroidetes*, se ha descrito su capacidad para secretar enzimas que participan en la degradación de compuestos orgánicos presentes en el suelo (Larsbrink & McKee, 2020). Además, varios estudios señalan su sensibilidad al manejo del suelo (Wolińska et al., 2017; Y. Yang et al., 2017; S. Zhang

et al., 2020). Así, es probable que la mayor proporción de materia orgánica encontrada en la finca OM promoviera el crecimiento de los miembros de *Bacteroidetes*. Por otro lado, se observaron diferencias en otros phyla entre ambas fincas, si bien la información sobre estos es más escasa o inconsistente. Este fue el caso de *Chloroflexi*. Aunque este phylum no ha sido ampliamente estudiado ni caracterizado, su abundancia se ha correlacionado con suelos pobres en nutrientes (S. A. Lee et al., 2020; Trivedi et al., 2016; Wolińska et al., 2017). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos una abundancia relativa mayor en el suelo OM, precisamente aquel con un contenido mayor en nutrientes. En este sentido, el estudio de Ma y colaboradores (2020) reportó una correlación positiva entre *Chloroflexi* y el contenido de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo rizosférico de plantas de trigo sometidas a una fertilización creciente de N, lo que podría justificar nuestros hallazgos, pues la finca OM presentaba una cantidad significativamente mayor de nitratos. Las diferencias en el contenido de nutrientes observado entre los suelos OM y CM también podría explicar la variación en abundancia relativa observada para el phylum *Nitrospirae*, particularmente el género *Nitrospira*, que fue significativamente más abundante en la finca OM. Especies de este género han llamado la atención recientemente por su capacidad para realizar la oxidación completa del amonio (comammox), desempeñando así un papel importante en el ciclo del nitrógeno (Daims et al., 2015; Hu et al., 2021; C. Li et al., 2021). Recientemente se ha demostrado la variabilidad de nicho dentro del grupo *Nitrospira*, asociada a sublinajes dentro de este género. Aunque no se conoce en profundidad la relación entre los niveles de nutrientes y el crecimiento de los miembros de cada clado, parece claro que la fertilización orgánica mediante el cambio de los niveles de nitrógeno del suelo puede afectar a su crecimiento (Han et al., 2018; He et al., 2022; C. Li et al., 2021). Además, el incremento de la abundancia relativa en los miembros de *Nitrospira* está relacionado con un aumento de la nitrificación, como muestran los resultados de FAPROTAX.

La abundancia relativa de los géneros *Rubrobacter* y *Sphingomonas* también difería entre las fincas OM y CM. Los miembros de estos géneros son capaces de colonizar ambientes hostiles y se ha descrito su capacidad para metabolizar diferentes pesticidas y contaminantes (Holmes et al., 2006; Leys et al., 2004; X. Li et al., 2015; Moffett et al., 2003; Sørensen et al., 2001). De hecho, en nuestro estudio, estos géneros

fueron significativamente más abundantes en la rizosfera de los olivos cultivados en la finca CM, donde se aplicaban herbicidas e insecticidas. En relación a esto, la degradación de compuestos aromáticos fue mayor en la rizosfera de OM, según los resultados de FAPROTAX. Esto estaba relacionado con géneros como *Nocardioides* y *Rhodococcus*, que eran significativamente más abundantes en esta finca. De hecho, se ha demostrado que la adición de fertilizantes orgánicos como el estiércol al suelo mejora la degradación de contaminantes, probablemente debido a un aumento de la diversidad, de los niveles de nutrientes y a una mejor textura del suelo (Haritash & Kaushik, 2009; Medina et al., 2020; M. Wu, Guo, et al., 2020). El análisis con FAPROTAX también destacó la quitinólisis como una de las funciones metabólicas enriquecidas en la rizosfera de los olivos cultivados en la finca OM. Se ha demostrado que la quitinólisis está implicada en la defensa contra hongos patógenos y nemátodos (Kielak et al., 2013). La ureólisis también aumentó significativamente en la rizosfera de OM. Se sabe que las enmiendas de estiércol proporcionan urea al suelo, lo que constituye una fuente de nitrógeno para las plantas debido a la presencia de microorganismos ureolíticos (Harder Nielsen et al., 1998; R. Zhao et al., 2022). En general, nuestros resultados sugieren que el estiércol de oveja favorece la presencia de bacterias implicadas en procesos beneficiosos como la mejora en los ciclos biogeoquímicos del suelo, la degradación de contaminantes recalcitrantes y la defensa contra patógenos del suelo.

De manera destacable, la comunidad bacteriana de la endosfera de la raíz estaba dominada por representantes del phylum *Actinobacteria*, de acuerdo con un estudio anteriormente publicado en nuestro grupo de investigación (Fernández-González et al., 2019). Además, *Actinophytocola* fue el género más abundante en la endosfera de la raíz del olivo. Esto enfatiza el papel clave que este género parece jugar en el interior de las raíces del olivo ya que los diferentes manejos agronómicos no parecen afectar a su alta abundancia relativa dentro de este órgano de la planta. Las actinobacterias son bien conocidas por la producción de metabolitos secundarios que juegan un papel importante en la salud de los árboles, como por ejemplo en la defensa frente a patógenos. En particular, varios aislados de *Actinophytocola* ya han mostrado actividades antimicrobianas (Bouznada et al., 2016). Además, un estudio realizado dentro de nuestro grupo de investigación indagó sobre la correlación entre la

abundancia de *Actinophytocola* y la expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógenos en la raíz del olivo (Fernández-González et al., 2021). Así, es importante enfatizar la necesidad de más investigación para aislar y caracterizar miembros de este género colonizadores del olivo, así como estudiar su relación con la salud de la planta.

En cuanto a la comunidad fúngica, la composición taxonómica estaba dominada por miembros del phylum *Ascomycota* en ambos compartimentos. Además, este phylum fue significativamente más abundante en la finca CM, tanto en la endosfera de la raíz como en la rizosfera. Esto concuerda con estudios previos centrados en comunidades endófitas de diversas especies vegetales, incluyendo el olivo (Fernández-González et al., 2019; Hardoim et al., 2015). Algunos estudios han reportado una alta abundancia de miembros de *Ascomycota* en suelos con mayor contenido en nitrógeno (Weber et al., 2013; G. Ye et al., 2021; J. Zhou et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados mostraron lo contrario ya que la finca CM tenía claramente un menor contenido en nutrientes, incluyendo N. Además, también se encontraron diferencias en la abundancia relativa de *Glomeromytoca* entre condiciones y en ambos compartimentos. De hecho, en la endosfera de la raíz, *Glomeromytoca* fue más abundante en la finca CM. Se sabe que los olivos forman asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos arbusculares que se implementan cada vez más durante la etapa de propagación en viveros para mejorar el establecimiento de la planta en condiciones de campo (Calvente et al., 2004; Montes-Borrego et al., 2014). En este sentido, la reducción de miembros de *Glomeromytoca*, específicamente *Rhizophagus*, en la finca OM puede deberse a la mayor cantidad de fósforo en este suelo, ya que se sabe que este elemento inhibe el establecimiento de la simbiosis de representantes del phylum *Glomeromytoca* (Balzergue et al., 2013; Nouri et al., 2021). A nivel de género, la composición de la comunidad fúngica confirmó nuestros estudios previos mostrando una alta abundancia de *Solicoccozyma*, *Mortierella* y *Coniosporium* en la rizosfera (Fernández-González, Wentzien, et al., 2020). En la endosfera de la raíz, *Diaporthe* fue identificado como el género más abundante en ambas fincas. Este género incluye endófitos descritos anteriormente en plantas herbáceas y leñosas, particularmente en olivos (Gomes et al., 2013; Martins et al., 2016). Curiosamente, los miembros de este género producen

metabolitos secundarios como compuestos antimicrobianos (Gomes et al., 2013; G. Li et al., 2015; Xu et al., 2021). Merece la pena mencionar otros géneros que mostraron diferencias en su abundancia entre condiciones. Por ejemplo, *Preussia* fue significativamente más abundante en la finca OM, tanto en la endosfera de la raíz como en la rizosfera. Las especies de *Preussia* se han descrito principalmente como endófitos coprófilos y se ha demostrado que su abundancia aumenta en los campos con enmiendas de estiércol. Además, sus miembros pueden producir metabolitos secundarios, como compuestos antimicrobianos, lo que les confiere la capacidad de luchar contra patógenos (Hartmann et al., 2015; Mapperson et al., 2014; Semenov et al., 2022). Otros géneros se encontraron como endófitos, como los miembros de *Cladophialophora*, cuya abundancia fue significativamente mayor en OM. Los representantes de este género pertenecen a los llamados hongos endófitos septados oscuros que han sido descritos como promotores del crecimiento vegetal. Además, algunos de ellos han sido descritos como eficaces agentes de biocontrol en varios cultivos (Harsonowati et al., 2020; Thambugala et al., 2020). No obstante, la finca de CM también mostró una gran abundancia de diversos géneros con capacidades antifúngicas, por ejemplo, *Aerobasidium* y *Alternaria*, que han sido descritos como endófitos del olivo, particularmente en la filosfera (Costa et al., 2021; Martins et al., 2019; Materatski et al., 2019; Nicoletti et al., 2020). Además, *Aerobasidium* se ha utilizado eficazmente para el control de la antracnosis del olivo (Costa et al., 2021; Martins et al., 2019). Por último en cuanto a la comunidad fúngica, se observaron diferencias significativas en los grupos funcionales asignados según FunGuilds. En este sentido, la finca OM presentó una mayor abundancia de grupos funcionales involucrados en la metabolización de los nutrientes enriquecidos en esta finca, como es el caso de la materia orgánica, saprófitos de estiércol y hojarasca. Esto se observó tanto para la rizosfera como para la endosfera, apuntando al efecto del manejo agrícola en las comunidades fúngicas asociadas a la raíz del olivo.

Finalmente, se construyeron redes de coocurrencia para ambos tratamientos y compartimentos. Estudios previos han mostrado un aumento en la complejidad de las redes microbianas del suelo sometidas a la aplicación de estiércol (Ling et al., 2016; Liu et al., 2020; Shi et al., 2021; G. Ye et al., 2021). En relación con el microbioma radicular,

se ha descrito una correlación entre la complejidad de la red y la intensificación agrícola, siendo la agricultura ecológica la que mayor complejidad presentó en la red de interacciones fúngicas (Banerjee et al., 2019). P. Wang y colaboradores (2022) estudiaron el efecto de la aplicación de estiércol en la comunidad microbiana de la rizosfera del trigo (bacterias y hongos), encontrando una mayor complejidad asociada a la aplicación de estiércol. Esto también se ha comprobado en plantas leñosas, como es el caso de los álamos (*Populus*) (G. Wang et al., 2022). Así, la enmienda con estiércol puede afectar a las redes microbianas de dos maneras (G. Ye et al., 2021). Por un lado, el estiércol proporciona al suelo una variedad de fuentes de nutrientes, aumentando así los nichos del suelo y las interacciones microbianas. Por otro lado, el estiércol contiene materia orgánica recalcitrante y su degradación requeriría de la cooperación entre microorganismos. Según nuestro estudio, en la finca OM observamos una mayor complejidad en las redes de la rizosfera de olivos, así como un mayor porcentaje de interacciones positivas, probablemente relacionadas con un mayor nivel de nutrientes. En relación a esto, varios estudios también han reportado una disminución de la distancia geodésica media (GD) tras la aplicación de estiércol (G. Wang et al., 2022; G. Ye et al., 2021). En nuestro estudio, esta tendencia se observó tanto en la rizosfera como en la endosfera de la raíz. Una distancia geodésica menor implica que las interacciones en la red se extienden de forma más eficiente (Strang et al., 2018). Así, una comunidad microbiana con un GD menor puede tener una mayor estabilidad en presencia de perturbaciones (Gómez-Lama Cabanás et al., 2022; Qu et al., 2020; Tao et al., 2018). En este sentido, nuestros resultados proporcionan pruebas de un efecto positivo de la enmienda de estiércol en las comunidades microbianas, mejorando potencialmente la salud de los árboles. De hecho, se ha propuesto que las redes complejas podrían ayudar a la planta a enfrentarse a los ataques de patógenos y al estrés medioambiental (Fernández-González, Cardoni, et al., 2020; Ling et al., 2016; Liu et al., 2020; Tao et al., 2018; Wagg et al., 2019). Por el contrario, se observó una disminución de la complejidad de las redes en el compartimento de la endosfera radicular de los árboles cultivados en la finca OM. Se sabe poco sobre el efecto de las prácticas agrícolas en la comunidad microbiana de la endosfera, especialmente en lo que respecta a las redes de coocurrencia. Por lo tanto, nos gustaría enfatizar que se necesitaría más investigación

para entender el efecto de la gestión agrícola en el microbioma de la endosfera radicular, así como su impacto en la salud del olivar.

En general, nuestros resultados mostraron una influencia de la aplicación de estiércol de oveja en las propiedades del suelo y en las comunidades microbianas de la raíz. Esta influencia se evidenció a través de varios resultados. En primer lugar, se observó un aumento en el contenido de nutrientes del suelo. Además, se encontró una mayor diversidad fúngica en la finca con manejo orgánico, así como una mayor biomasa fúngica en la rizosfera. En cuanto al conjunto de datos bacterianos, se infirieron funciones metabólicas de interés relacionadas con la degradación de contaminantes y la defensa contra patógenos. Por último, la red de coocurrencia microbiana mostró un escenario favorable, con más interacciones positivas, mayor complejidad y una GD menor en la finca con manejo orgánico. Según nuestros resultados, concluimos que la aplicación de estiércol de oveja en los olivares tiene un impacto potencialmente beneficioso en las propiedades del suelo y en las comunidades microbianas de la raíz.



# **CAPÍTULO IV**



## CAPÍTULO IV: EL MICROBIOMA DE LA SEMILLA DE OLIVO.

### IV.1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, el interés en el estudio del microbioma asociado a plantas se ha extendido rápidamente. Esto no sólo ha facilitado el conocimiento de su composición y estructura, sino también de su influencia y contribución en la salud, desarrollo, productividad y resiliencia del holobionte vegetal frente a diferentes tipos de estrés. Numerosas investigaciones han demostrado que la microbiota vegetal participa activamente en numerosos procesos beneficiosos para la planta. Estos incluyen, entre otros, facilitar la absorción de nutrientes, proporcionar defensa frente a patógenos o promover el crecimiento de la planta (Trivedi et al., 2020). Si bien los estudios existentes se han centrado en numerosos compartimentos vegetales, cabe señalar que algunos órganos de la planta, en particular los que intervienen directamente en la producción de descendencia, han recibido comparativamente menos atención (Shade et al., 2017).

En este sentido, existe una creciente evidencia sobre la presencia de microorganismos en las semillas de diversas especies vegetales (Bergna et al., 2018; Simonin et al., 2022; Wassermann, Cernava, et al., 2019; Wassermann et al., 2021). El interés sobre esta comunidad de microorganismos no sólo radica en conocer los mecanismos de transmisión y selección de la microbiota de una generación a otra, sino en el papel que estos microorganismos pueden desempeñar en el desarrollo de la planta. Así, se han descrito microorganismos colonizadores de semilla que desempeñan funciones en procesos tan cruciales como la germinación de las mismas. De hecho, un estudio con semillas de *Lolium rigidum* tratadas térmicamente con el fin de reducir la población bacteriana, dio como resultado un aumento pronunciado del periodo de latencia de la semilla junto con una reducción de los niveles de citoquininas de la misma (Goggin et al., 2015). Por su parte, Walitang y colaboradores (2017) aislaron endófitos de semilla de arroz y los inocularon en semillas de cultivares con diferentes niveles de sensibilidad a la salinidad, lo que resultó en un aumento del crecimiento de las plántulas y de la tasa de germinación de las semillas bajo estrés salino. De igual modo, en trigo se han descrito endófitos de semilla que ayudan a la planta a resistir la deficiencia hídrica

(Hone et al., 2021). Además, se ha demostrado que los endófitos de semillas son determinantes en la resistencia a patógenos en cultivos de cereales, tal y como ocurre con el endófito *Sphingomonas melonis*, cuya acumulación en semillas de arroz protege a la planta contra el patógeno *Burkholderia plantarii* (Matsumoto et al., 2021). Así, la evidencia apunta a un papel de importancia del microbioma de la semilla en la salud vegetal, constituyendo por tanto un reservorio de microorganismos de interés. Sin embargo, el microbioma de la semilla sigue suscitando muchas preguntas por responder y el conocimiento de su composición en diversas especies vegetales es todavía escaso (Abdelfattah et al., 2022).

Uno de los aspectos poco conocidos del microbioma de las semillas es el proceso de ensamblaje de la comunidad, es decir, los factores que determina su composición y estructuración (Abdelfattah et al., 2022). Los microorganismos de la semilla pueden ser adquiridos por varias vías. Por una parte, puede haber una transmisión de la planta a la semilla, donde se dará tanto una contribución materna, en la que se pueden transmitir endófitos de diferentes órganos de la planta (como raíces o xilema), así como microorganismos del óvulo. La contribución paterna se limitaría a la microbiota del polen. En esta fase, también existe una contribución de la microbiota transmitida por los polinizadores. Por otro lado, durante el período de dormancia de la semilla, se da una mayor contribución de microorganismos ambientales, como aquellos asociados a diferentes especies animales frugívoras o asociados a las prácticas de tratamiento y almacenamiento de la semilla (Abdelfattah et al., 2022). Sin embargo, muchos de estos procesos carecen de validación experimental, lo que explica nuestra limitada comprensión de los mecanismos que regulan estas vías de transmisión así como de las diferencias que pueden darse entre especies vegetales (Abdelfattah et al., 2022). En el caso concreto del olivo (*Olea europaea* L.), existen varios estudios sobre las comunidades microbianas presentes en diferentes órganos o compartimentos de la planta, como la carposfera (Abdelfattah et al., 2015; Malacrino et al., 2022), flores (Abdelfattah et al., 2015), filosfera (Abdelfattah et al., 2015; Malacrino et al., 2022), endorrizosfera (Fernández-González et al., 2019) y fluido xilemático (Anguita-Maeso et al., 2021). A pesar de esto, apenas se encuentran evidencias experimentales en cuanto a la transmisión de esta microbiota (o constituyentes específicos de la misma) a

las semillas. Abdelfattah y colaboradores (2015) documentaron una sorprendente similitud entre las comunidades fúngicas encontradas en las drupas del olivo y las flores. Asimismo, la transmisión de la microbiota de la semilla a la plántula resulta de interés por su implicación en la salud vegetal (Mueller & Linksvayer, 2022; Rodríguez et al., 2020). En relación a esto, y a pesar de la disponibilidad de pruebas empíricas sobre la influencia de la microbiota de la semilla en la germinación de la misma y el crecimiento de la plántula (Cope-Selby et al., 2017; Goggin et al., 2015; Sánchez-López et al., 2018), aún queda mucho por explorar sobre los mecanismos detallados que subyacen a estos procesos (Rodríguez et al., 2020). Además de esto, la transmisión de microorganismos a través de la semilla resulta de interés para los programas de mejora genética. En este sentido, algunos autores proponen el término de “cruzamiento de microbiomas”, esto es, programas de mejora genética a través de cruzamientos, donde se seleccionan individuos en función a los microorganismos transmitidos por la semilla, especialmente aquellos con efectos relevantes para la salud de la planta (Mueller et al., 2021; Mueller & Linksvayer, 2022).

Para comprender los procesos relacionados con el ensamblaje y la heredabilidad del microbioma de las semillas, el primer paso consiste en conocer qué microorganismos están presentes en las semillas de distintas especies vegetales. Un metaanálisis reciente realizado por Simonin y colaboradores (2022), ha puesto de manifiesto el hecho de que la mayoría de los estudios disponibles sobre microbioma de semillas se centran en las plantas herbáceas. Por el contrario, y a pesar de su relevancia económica, social y ecológica en diversos ecosistemas agroforestales, el microbioma de semillas de plantas leñosas ha sido poco investigado (Abdelfattah et al., 2021; Fort et al., 2021; Heitmann et al., 2021; Wassermann, Müller, et al., 2019). En el caso del olivo, y hasta la fecha de esta Tesis Doctoral, no se había explorado el microbioma de sus semillas. El cultivo del olivo y la producción del aceite de su fruto son componentes cruciales de la economía, la cultura y la sociedad mediterráneas (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020; Uylaşer & Yildiz, 2014). Dada la importancia económica de la producción de aceite de oliva y la creciente preocupación por los efectos que el cambio climático puede tener en el rendimiento del cultivo así como en la calidad del aceite (*Aforo de producción de olivar en Andalucía*, 2023; NASA Earth Observatory, 2023), resulta de interés el estudio de la

microbiota de la semilla. Este conocimiento permitiría sentar las bases para futuras investigaciones dirigidas a dilucidar los posibles procesos de transmisión vertical de componentes específicos de la microbiota del olivo, investigar el impacto de la microbiota de la semilla en la germinación, su relevancia para los programas de mejora genética, así como realizar aislamientos de microorganismos potencialmente beneficiosos para la salud, el desarrollo y la adaptación del holobionte olivo (Arias-Calderón et al., 2015; Berg & Raaijmakers, 2018; Kusstatscher et al., 2021; Rallo et al., 2018).

Así, en este estudio, se propuso abordar los siguientes objetivos: (i) describir la composición de la microbiota de la semilla de olivo utilizando genotipos de diferentes orígenes geográficos, (ii) describir los constituyentes de la microbiota compartidos entre diferentes genotipos de olivo, y (iii) examinar si los microorganismos de la semilla pueden provenir de la endosfera radicular. Además, evaluamos la hipótesis de que el genotipo del olivo es un factor importante en la conformación de la microbiota de la semilla. Para este estudio, se desarrolló una metodología para obtener muestras de la endosfera de la semilla a partir de huesos de aceituna en condiciones estériles para garantizar que el ADN microbiano procediera exclusivamente de este órgano reproductor.

### **IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

En este apartado, se presenta el diseño experimental seguido para la obtención y análisis de los datos presentados en este capítulo. Para más detalles técnicos sobre la metodología seguida, se recomienda al lector remitirse a la sección de Material y Métodos de esta Tesis Doctoral.

El diseño experimental del estudio de este capítulo se basó en la recolección de aceitunas de olivos de la WOGC, localizada en el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA, Córdoba, España). Las aceitunas fueron tomadas de diez genotipos de olivos, ocho de ellos usados en agricultura y dos de la variedad silvestre. Se recolectaron 10 aceitunas por genotipo, tomadas de dos árboles diferentes. Para la extracción de la semilla, se eliminaron el epicarpo y el mesocarpo del fruto para obtener el endocarpo (hueso de la aceituna), que fue limpiado y secado al aire. El endocarpo fue

esterilizado superficialmente (véase el Apartado M.2.3.) y se extrajo la semilla de su interior utilizando un cortador de tubos estándar, previamente esterilizado. Se extrajo el ADN y este fue enviado a secuenciación al Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada), donde se utilizó la tecnología Illumina MiSeq (2x275 PE). Se secuenciaron las regiones V3-V4 del gen *16S rRNA* y la región ITS2 para la caracterización de las comunidades bacterianas y fúngicas, respectivamente. Además, se incluyeron tres réplicas de una comunidad sintética adquirida comercialmente. Previamente a esta secuenciación, se llevó a cabo una primera PCR con los primers 63UF-1115UR con objeto de reducir la amplificación de ADN del hospedador en la librería bacteriana. Con el mismo objetivo, se incluyó una concentración de PNAs mayor a la utilizada normalmente en previas secuenciaciones (concentración cuatro veces mayor, en concreto, de 10  $\mu$ M). Además de la secuenciación, el ADN obtenido fue utilizado para realizar una cuantificación mediante PCR cuantitativa de la comunidad de arqueas, mediante la secuenciación de fragmentos del gen *16S rRNA* específicos de este dominio.

Para procesar las lecturas obtenidas, se siguieron los pasos del tutorial asociado a la librería Micro4all, cuyo funcionamiento se ha detallado ampliamente en el capítulo I de esta Tesis Doctoral. Siguiendo este tutorial se llevó a cabo el filtrado de calidad de las secuencias, la inferencia de los ASVs con DADA2, la eliminación de secuencias del hospedador y secuencias mal asignadas (según los resultados de la comunidad sintética), así como la clasificación taxonómica con las bases de datos de RDP y UNITE, respectivamente para bacterias y hongos. Además, se llevaron a cabo análisis de diversidad microbiana tanto en términos de diversidad y riqueza ( $\alpha$ -diversidad) como de la estructura de la comunidad (diversidad  $\beta$ ). Por otro lado, se estudió el perfil taxonómico de los diferentes genotipos tanto a nivel de phylum como de género y se estudiaron aquellos taxones que presentaron diferencias estadísticamente significativas en su abundancia relativa utilizando la herramienta ANCOM-BC, implementada en la función *ancomloop* de Micro4all. Además, se llevó a cabo un agrupamiento de los genotipos según lo descrito por Díez y colaboradores (2015) en cuanto a la distancia genética de los mismos, en base a lo cual se llevaron a cabo los análisis de diversidad y abundancias diferenciales descritos anteriormente. Por otro lado, se estudió el

microbioma compartido entre genotipos utilizando el paquete de R microbiome. Para que un género formase parte del microbioma compartido, debía estar presente en al menos el 50 % de las réplicas de cada genotipo y, además, estar presente en al menos 6 de los 10 genotipos estudiados. Por otro lado, se identificaron los ASVs presentes tanto en las semillas como en la endorrizosfera de los mismos árboles, así como aquellos ASVs exclusivamente presentes en las semillas. Esto se llevó a cabo para los genotipos en común entre este estudio y el realizado previamente en nuestro grupo de investigación, siendo estos Arbequina, Picual, Koroneiki, Uslu y Frantoio (Fernández-González et al., 2019). Se compararon aquellos géneros presentes en al menos el 50 % de las réplicas de semilla para cada genotipo y en todas las réplicas de la endosfera radicular. Para el análisis de los ASVs específicos de semilla, solo se consideraron aquellos con una abundancia relativa media mayor al 1 % y con una prevalencia mayor al 19 %.

### IV.3. RESULTADOS

#### IV.3.1. Características generales de datos de secuenciación.

El número total de lecturas brutas obtenidas para los conjuntos de datos de bacterias y hongos fue de 7.370.663 y 7.312.666, respectivamente. El número de secuencias tras el filtrado de calidad, la inferencia de ASVs y la eliminación de quimeras y lecturas del hospedador, fue de 327.237 para la comunidad bacteriana y de 4.781.620 para la fúngica. Tras eliminar las muestras con menos de 500 lecturas, se retuvo un mínimo de 513 y un máximo de 41.633 secuencias por muestra del conjunto de datos procariótico; así como un mínimo de 9.643 y un máximo de 279.514 secuencias del conjunto de datos fúngico. El número final de ASVs retenidos para análisis posteriores fue de 1.206 (bacterias) y 1.084 (hongos). El número final de réplicas conservadas para análisis posteriores se detalla en la Tabla IV.1.

**Tabla IV.1. Detalles sobre los genotipos muestreados, así como número de muestras finales utilizadas en el análisis de datos de microbioma bacteriano y fúngico.** Para cada genotipo, se muestra el país de origen, la zona geográfica y la clasificación en agrupamientos genéticos según la definición de Díez y colaboradores (2015). También se muestra el número de muestras (semillas) finalmente retenidas por genotipo de olivo tras eliminar las lecturas de la planta hospedadora y las muestras con menos de 500 secuencias, tanto para los conjuntos de datos procarióticos como eucarióticos. WW: del inglés *Wild West* (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*), CM: Cuenca Mediterránea, Q1: agrupamiento genético 1, Q2:

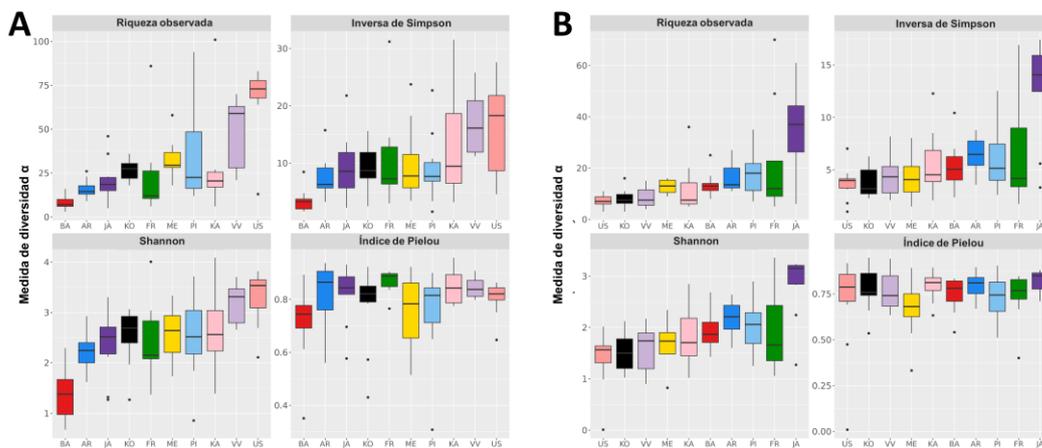
Genotipo	País de origen	Área geográfica	Agrupación genética	Número de réplicas	
				Bacterias	Hongos
Arbequina	España	CM Central	Q2	10	10
Barnea	Israel	CM Central	Q2	9	10
Frantoio	Italia	CM Central	Q2	6	8
Jaén (var. <i>sylvestris</i> )	España	CM Occidental	WW	10	10
Kalinjot	Albania	CM Oriental	Mosaico	6	10
Koroneiki	Grecia	CM Central	Q2	10	10
Menorca (var. <i>sylvestris</i> )	España	CM Occidental	WW	10	8
Picual	España	CM Occidental	Q1	10	10
Uslu	Turquía	CM Oriental	Mosaico	8	10
Verde Verdelho	Portugal	CM Occidental	Mosaico	9	10

### IV.3.2. El genotipo determina la diversidad y la estructura de las comunidades microbianas.

Tanto para las comunidades bacterianas como fúngicas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el índice de Shannon, la inversa de Simpson y la riqueza observada ( $P < 0,05$ , prueba de Kruskal-Wallis) al comparar los genotipos de olivo (Tabla IV.2). Curiosamente, el cultivar Barnea fue el genotipo con menor diversidad y riqueza bacteriana, mientras que los cultivares Verde Verdelho y Uslu mostraron los valores más altos (Figura IV.1). El patrón opuesto se observó para la comunidad fúngica, siendo el cultivar Uslu el genotipo con la menor riqueza y diversidad fúngica (Figura IV.1). Junto con estos hallazgos, también se demostró que la estructura de la comunidad estaba determinada por el genotipo, como indica el análisis de diversidad  $\beta$ . En concreto, el PERMANOVA dio lugar a diferencias estadísticamente significativas para ambos conjuntos de datos (Tabla IV.3) con una alta variabilidad explicada por el genotipo ( $R^2 = 0,34$  y  $R^2 = 0,11$  para las comunidades bacteriana y fúngica, respectivamente). Aunque la dispersión beta fue significativamente diferente entre genotipos para el conjunto de datos de procariotas ( $P = 0,003$  según una prueba multivariante de homogeneidad de dispersiones de grupo), la prueba ANOSIM ( $P = 0,001$ ) y los gráficos PCoA confirmaron una separación entre genotipos (Figura IV.2). Además, se distinguieron tres grupos claros en la comunidad bacteriana (es decir, genotipos sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos), a saber, los genotipos Frantoio-Jaén-Kalinjot, Uslu-Verde Verdelho y Koroneiki-Menorca (valor  $d p$  corregido  $> 0,05$ , prueba de *Adonis* por pares). Para la comunidad fúngica, en cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pares al corregir valores de  $p$ .

**Tabla IV.2. Comparaciones estadísticas de los índices de diversidad  $\alpha$  basadas en pruebas de Kruskal-Wallis entre genotipos.** Los valores en cursiva y negrita indican valores de  $p$  estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ).

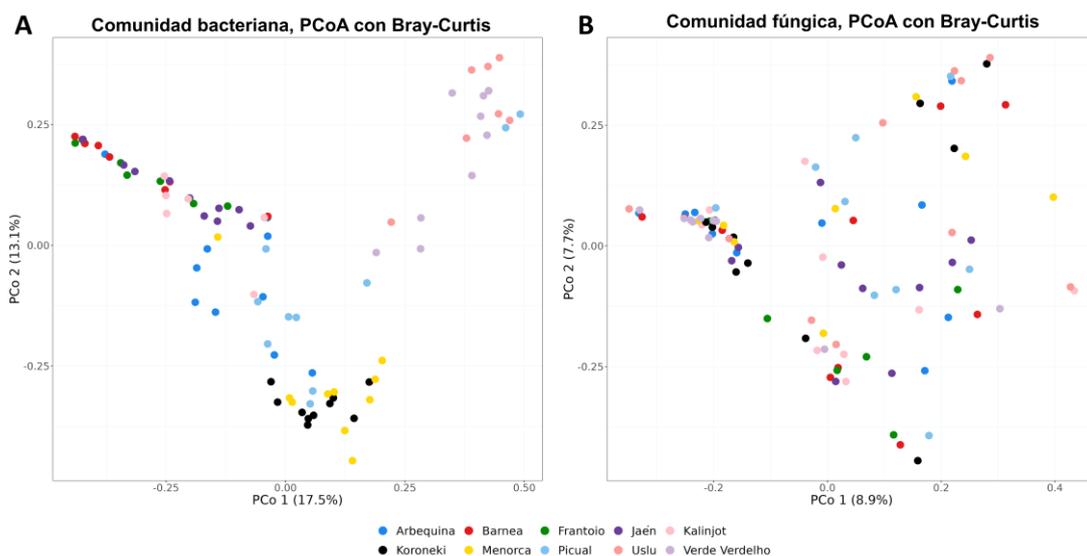
Comparación	ASVs Observados		Inversa de Simpson		Índice de Shannon		Índice de Pielou	
	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos
<b>Genotipo</b>	<b><i>1,84 · 10<sup>-6</sup></i></b>	<b><i>6,35 · 10<sup>-6</sup></i></b>	<b><i>6,75 · 10<sup>-5</sup></i></b>	<b><i>0,001</i></b>	<b><i>9,15 · 10<sup>-4</sup></i></b>	<b><i>2,75 · 10<sup>-4</sup></i></b>	0,20	0,48



**Figura IV.1. Índices de diversidad  $\alpha$  bacteriana (A) y fúngica (B) para cada genotipo de olivo.** En cada panel, se muestran cinco estadísticos: la mediana, dos percentiles (al 25 y al 75) y los valores máximos y mínimos. Los puntos indican valores atípicos. AR: Arbequina, BA: Barnea, FR: Frantoio, JA: Jaén, KA: Kalinjot, KO: Koroneiki, ME: Menorca, PI: Picual, US: Uslu, VV: Verde Verdelho.

**Tabla IV.3. Comparaciones estadísticas de los índices de diversidad  $\beta$  basadas en disimilitudes Bray-Curtis.** Los valores en cursiva y negrita indican valores de p estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ) según pruebas de PERMANOVA, BETADISPER y ANOSIM entre genotipos y agrupamientos genéticos.

Comparación	PERMANOVA		R <sup>2</sup>		BETADISPERSION		ANOSIM	
	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos	Bacterias	Hongos
<b>Genotipo</b>	<b><i>0,001</i></b>	<b><i>0,003</i></b>	0,34	0,11	<b><i>0,003</i></b>	0,74	<b><i>0,001</i></b>	<b><i>0,001</i></b>
<b>Agrupamiento genético</b>	<b><i>0,001</i></b>	0,241	0,12	0,03	0,26	0,169	<b><i>0,001</i></b>	0,84



**Figura IV.2. Análisis de coordenadas principales de las comunidades bacteriana (A) y fúngica (B).** Los gráficos de ordenación se calcularon utilizando disimilitudes de Bray-Curtis para cada genotipo estudiado.

### IV.3.3. El agrupamiento genético influye en la comunidad bacteriana de las semillas.

Según Diez y colaboradores (2015), los genotipos de olivo pueden agruparse en diferentes grupos genéticos que se correlacionan con su origen geográfico. En el análisis aquí presentado, se investigó si estos grupos podrían explicar algunas de las variaciones entre genotipos observadas en la comunidad microbiana de semillas de olivo. Así, nuestro estudio incluyó representantes de cuatro agrupamientos genéticos, a saber, Q1, Q2, Mosaico y West Wild (WW) (Tabla IV.1). En este respecto, el análisis de diversidad  $\beta$  mostró que los agrupamientos genéticos explicaban el 12 % de la variación entre muestras para la comunidad bacteriana (prueba PERMANOVA,  $P = 0,001$ ,  $R^2 = 0,12$ ), sin diferencias en la dispersión beta (prueba PERMDISP2,  $P = 0,26$ ; Tabla IV.3). Además, se encontraron diferencias entre todos los grupos, como muestra la prueba *pairwiseAdonis* (valor de  $p$  corregido  $< 0,05$ , Tabla IV.4.). Si bien este análisis también se llevó a cabo para la comunidad fúngica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla IV.3).

**Tabla IV.4. Comparaciones dos a dos de una prueba de PERMANOVA sobre disimilitudes Bray-Curtis de las comunidades bacterianas y fúngicas entre diferentes agrupamientos genéticos.** Los valores en negrita y cursiva indican valores estadísticamente significativos ( $P < 0,05$  ajustado mediante el método de corrección de Benjamini-Hochberg).

Comparación	Valor de $p$ ajustado	
	Bacterias	Hongos
Q2 vs. WW	<b><i>0,042</i></b>	0,574
Q2 vs. Mosaic	<b><i>0,003</i></b>	0,637
Q2 vs. Q1	<b><i>0,004</i></b>	0,268
WW vs. Mosaic	<b><i>0,003</i></b>	0,268
WW vs. Q1	<b><i>0,042</i></b>	0,268
Mosaic vs. Q1	<b><i>0,006</i></b>	0,480

### **IV.3.4. Primera descripción del microbioma de las semillas de olivo: composición y microbioma compartido.**

Los perfiles taxonómicos bacterianos a nivel de phylum estaban dominados por *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, que representaron al menos el 91 % de las secuencias en los diferentes genotipos estudiados (Figura IV.3). A nivel de género, las diferencias entre genotipos fueron más pronunciadas. Los géneros más abundantes fueron *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Promicromonospora* y *Acidipropionibacterium* (Figura IV.3). Además, estos géneros formaban parte del microbioma compartido de semillas, es decir, presentaron una prevalencia muestral superior al 50 %, encontrándose en al menos 6 de los 10 genotipos analizados. En cuanto a *Streptomyces*, se observó una agrupación de genotipos según la abundancia relativa de este género, es decir, los genotipos de un mismo grupo presentaban abundancias relativas similares de *Streptomyces*. Esta observación fue corroborada por ANCOM-BC, que no indicó diferencias estadísticamente significativas dentro de los grupos (valor de  $p$  corregido  $> 0,05$ ). Además, esta agrupación fue la misma que mostró el análisis de diversidad  $\beta$ , correspondiendo con los genotipos Frantoio-Jaén-Kalinjot (en los que *Streptomyces* estaba ausente o presentaba una abundancia relativa muy baja), genotipos Koroneiki-Menorca (en los que *Streptomyces* era el género principal) y cvs. Uslu-Verde Verdelho (en los que se encontraba una abundancia relativa de *Streptomyces* intermedia respecto a los otros dos grupos).

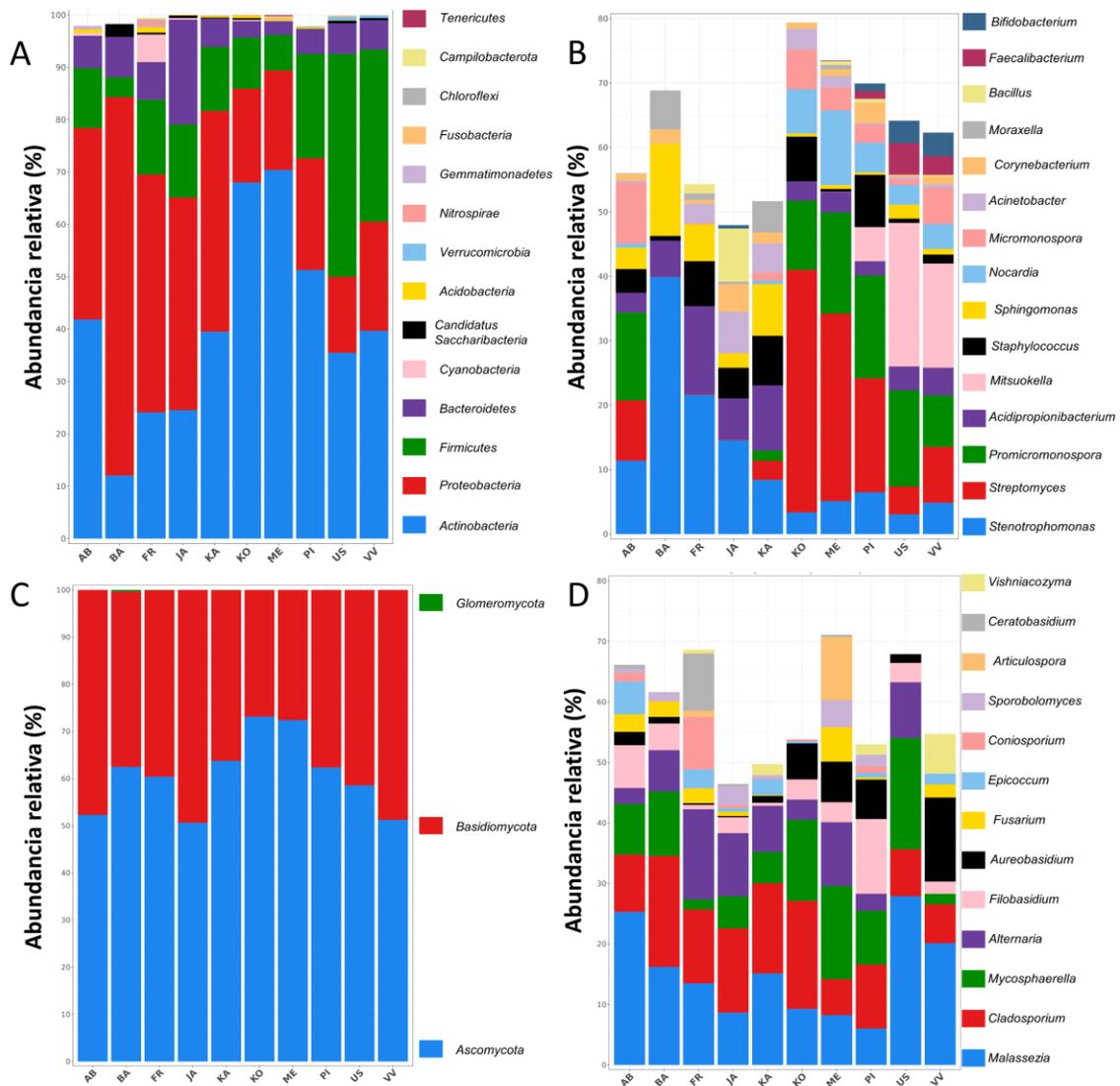


Figura IV.3. Perfiles taxonómicos bacterianos (A, B) y fúngicos (C, D) de semillas de diferentes genotipos de olivo. La composición microbiana se muestra a nivel de phylum (A, C) y género (B, D). Se presentan los 15 taxones más abundantes. AR: Arbequina, BA: Barnea, FR: Frantoio, JA: Jaén, KA: Kalinjot, KO: Koroneiki, ME: Menorca, PI: Picual, US: Uslu, VV: Verde Verdelho.

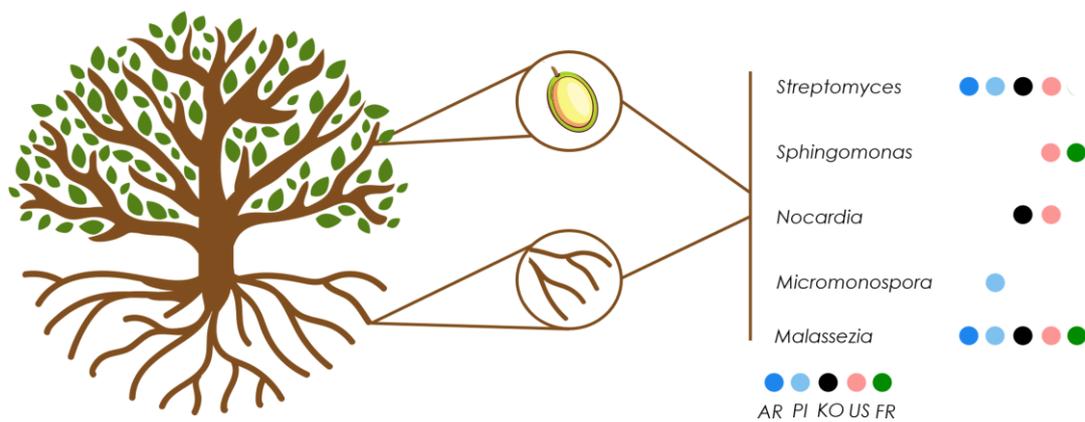
En cuanto a la comunidad fúngica, los phyla más abundantes fueron *Basidiomycota* y *Ascomycota* (Figura IV.3). De hecho, estos dos phyla representaron el 100 % de las secuencias en la mayoría de los genotipos. Cabe destacar que las semillas de tres genotipos (Barnea, Kalinjot y Frantoio) también albergaron miembros del género *Rhizophagus* (phylum *Glomeromycota*), el cual representó el 0,33, 0,04 y 0,06 % de las secuencias, respectivamente. En cuanto a la composición a nivel de género, las comunidades estaban dominadas principalmente por *Malassezia*, *Cladosporium* y *Mycosphaerella* (Figura IV.3). De hecho, estos géneros también formaban parte del microbioma compartido entre genotipos. En concreto, *Malassezia* estuvo presente en todos los genotipos y en más del 50 % de las muestras.

En cuanto a la cuantificación de *Archaea*, en los experimentos de PCR cuantitativa no se observó un nivel de amplificación suficiente en las muestras respecto a la amplificación basal del control negativo. Así pues, en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, no se detectaron arqueas en las semillas de olivo.

### **IV.3.5. Identificación de ASVs presentes tanto en la semilla como en la endosfera de la raíz del olivo.**

Con el fin de examinar si componentes específicos del microbioma de la endosfera de la raíz se encuentran presentes en el microbioma de la semilla, escenario que sugeriría el movimiento acropetal de endófitos desde las raíces a las semillas dentro del mismo olivo, se evaluó el microbioma compartido entre muestras de los órganos mencionados. Esto se realizó tanto a nivel de comunidad bacteriana como fúngica, utilizando los genotipos comunes entre el estudio aquí presentado y el realizado previamente en nuestro grupo de investigación donde se analizó el microbioma de la endosfera radicular de los mismos árboles (Fernández-González et al., 2019). Se analizaron los cinco genotipos comunes entre ambos estudios (es decir, Arbequina, Picual, Koroneiki, Uslu y Frantoio). La comunidad bacteriana encontrada tanto en las semillas como en la endosfera de las raíces estaba compuesta principalmente por miembros de *Actinobacteria*, en concreto, *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia*. También se detectó un miembro del phylum *Proteobacteria* (*Sphingomonas*). Cabe

mencionar que *Streptomyces* se encontró como género compartido entre semilla y endorrizosfera para todos los genotipos, excepto para Frantoio (debido a su baja prevalencia en dicho cultivar). En cuanto a la comunidad fúngica, los miembros del género *Malassezia* estaban presentes en ambos compartimentos y en todos los genotipos estudiados (Figura IV.4).



**Figura IV.4. Géneros presentes en las semillas y en la endosfera radicular de los mismos genotipos.** Se muestran los géneros comunes encontrados en cinco genotipos de olivo (véase el texto principal para más detalles). AR: Arbequina, FR: Frantoio, KO: Koroneiki, PI: Picual, US: Uslu.

En cuanto al microbioma específico de las semillas de olivo, un total de cinco ASVs se detectaron en las semillas de olivo, pero no en la endosfera radicular, con una abundancia relativa > 1 % (media de las abundancias relativas entre muestras) y una prevalencia > 19 % (ASVs con una abundancia relativa mayor a 0 presentes en al menos el 19 % de las muestras). A nivel de género, estos ASVs se clasificaron como *Stenotrophomonas* (abundancia relativa media del 11,40 %), *Micromonospora* (2,69 %), *Mitsuokella* (dos ASVs; 1,99 y 1,25 %) y *Streptomyces* (1,15 %).

### IV.4. DISCUSIÓN

Con los resultados aquí presentados, describimos por primera vez la microbiota de la semilla de olivo. Si bien esta microbiota presentó numerosas singularidades respecto a lo descrito para otras especies vegetales, se encontraron algunas similitudes generales. En primer lugar, la comunidad microbiana estuvo dominada por cuatro phyla bacterianos: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y dos phyla fúngicos: *Basidiomycota* y *Ascomycota*. Este resultado concuerda con un metaanálisis reciente de muestras de semillas de 50 especies vegetales diferentes (Simonin et al., 2022). A nivel de género, y de acuerdo con la composición de las semillas de otras especies vegetales (Simonin et al., 2022), *Cladosporium* fue muy abundante en la comunidad fúngica de las semillas de olivo y apareció como miembro del microbioma compartido de los genotipos analizados. Este resultado confirma estudios anteriores centrados en endófitos procedentes de diferentes órganos o compartimentos del olivo, como la hoja, el fruto, la flor y ramas (Abdelfattah et al., 2015; Costa et al., 2021). Además, los miembros de este género se han asociado con potenciales actividades de biocontrol contra fitopatógenos del olivo (Moral & Trapero, 2009; X. Wang et al., 2013). Estos resultados apuntan a la necesidad de futuros estudios enfocados en el aislamiento y caracterización de miembros de este género procedentes de diferentes tejidos y órganos del olivo, incluidas las semillas.

Además de las similitudes mencionadas con otras especies vegetales, en nuestro estudio se encontraron características distintivas de la microbiota de las semillas de olivo. En primer lugar, *Actinobacteria* fue el phylum bacteriano más abundante, mientras que la mayoría de las semillas de plantas estudiadas hasta ahora muestran un predominio de *Proteobacteria* (Simonin et al., 2022). En este sentido, cabe destacar que el phylum *Actinobacteria* ha sido descrito como el más predominante en la endosfera de la raíz de los mismos árboles en un estudio anterior de nuestro grupo de investigación (Fernández-González et al., 2019), así como en árboles del cv. Picual cultivados bajo diferentes manejos agrícolas (Wentzien et al., 2023). Sin embargo, los conocimientos sobre las condiciones específicas que promueven el crecimiento de *Actinobacterias* en determinadas partes de esta especie arbórea son limitados, así como la importancia de

su papel en la formación de la comunidad microbiana general y su impacto en la salud del holobionte olivo (Fernández-González et al., 2019, 2021). Las actinobacterias son conocidas por su capacidad para nutrirse de azúcares complejos (Barka et al., 2016), que son el principal suministro de carbohidratos en órganos sumideros como raíces y semillas (Maestri et al., 2019; T.T. Kozlowski, 1992). En línea con este resultado, el microbioma de semilla compartido entre genotipos estuvo compuesto principalmente por actinobacterias. En concreto, *Streptomyces* parece ser un miembro clave de la comunidad microbiana del olivo. Esto se ve reforzado por el hecho de que ciertos genotipos podrían agruparse según la abundancia relativa de este género en su semilla, agrupación que coincidía con el patrón observado al analizar la estructura de la comunidad utilizando las disimilitudes de Bray-Curtis. De hecho, *Streptomyces* ha sido previamente descrito como uno de los géneros más abundantes en la endosfera de la raíz de los mismos árboles aquí analizados (Fernández-González et al., 2019) y en árboles del cv. Picual sometidos a diferentes manejos agronómicos (Wentzien et al., 2023). Los miembros de *Streptomyces* son ampliamente conocidos por su papel beneficioso para la salud vegetal, con muy pocas especies causantes de enfermedades en plantas (Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016). Si bien no se han realizado estudios sobre el papel de *Streptomyces* en la germinación de semillas, se sabe que algunos de sus aislados producen auxinas (Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016). Se ha descrito que esta hormona vegetal participa en la regulación de la germinación de las semillas, alargando el período de latencia (Mei et al., 2023; Miransari & Smith, 2014; M. Wu, Wu, et al., 2020). Además, se sabe que las auxinas producidas en el endospermo regulan positivamente el desarrollo de semillas y frutos (Figueiredo & Köhler, 2018; Guo et al., 2022). Con todo lo mencionado, la presencia de *Streptomyces* en las semillas de olivo podría relacionarse con su papel en el crecimiento del fruto, así como en la germinación de la semilla. Otros miembros del phylum *Actinobacteria* presentes en el microbioma compartido de la semilla fueron *Promicromonospora* y *Acidipropionibacterium*. Curiosamente, se ha descrito anteriormente un miembro de *Promicromonospora* que produce giberelinas, unas hormonas vegetales que regulan el crecimiento de las plantas, la germinación de las semillas, la floración y la producción de frutos, entre otros (Kang et al., 2012). En cuanto a *Acidipropionibacterium* spp., sus aislados se han estudiado principalmente en productos lácteos como bioconservantes debido a la producción de

ácido propiónico, que actúa como agente antifúngico (Turgay et al., 2022). Por otro lado, en la microbiota de la semilla del olivo también se encontraron géneros con funciones interesantes para la salud humana, como *Faecalibacterium*. En concreto, la especie *Faecalibacterium prausnitzii* representa el 5 % de la microbiota fecal y es escaso en pacientes con disbiosis microbiana, por lo que es un probiótico muy prometedor (O'Toole et al., 2017; H. Zhang et al., 2022).

En cuanto a la composición de la comunidad fúngica, *Malassezia* fue el género fúngico más abundante y prevalente, siendo una característica muy distintiva de la microbiota de la semilla de olivo (Simonin et al., 2022). Aunque la mayoría de estudios sobre este género se centran en sus efectos sobre la salud humana, el género *Malassezia* ha sido descrito en diferentes ecosistemas y nichos, incluidos sedimentos marinos y raíces de orquídeas (Amend, 2014). Cabe destacar que todas las especies de *Malassezia*, excepto *M. pachydermatis*, dependen de suministros externos de lípidos para sobrevivir, ya que su vía metabólica de síntesis de ácidos grasos es incompleta (Saunders et al., 2012). Dado que el endospermo de las semillas de olivo alberga un alto contenido de ácidos grasos (Zafra et al., 2018), el crecimiento de *Malassezia* podría verse favorecido en este órgano. Además, la presencia de *Glomeromycota* en las semillas de olivo es otra característica de interés. Aunque la transmisión de hongos micorrícicos arbusculares a semillas de plantas parece ser poco frecuente (Simonin et al., 2022), se ha demostrado la presencia de *Glomeromycota* en tres genotipos de olivo analizados en nuestro estudio (cvs. Frantoio, Barnea, y Kalinjot) aunque a un nivel de abundancia relativa muy bajo. También se ha descrito una baja abundancia de *Glomeromycota* en semillas de otras plantas leñosas, como es el caso del roble común (*Quercus robur*) (Abdelfattah et al., 2021). Así, la colonización temprana de hongos micorrícicos podría ser un factor importante para el establecimiento y crecimiento de plántulas a partir de semillas (Nara, 2006). Nuestro hallazgo podría ser relevante para los programas de mejora del olivo, ya que la selección de semillas basada en la presencia de *Glomeromycota* podría aumentar las tasas de crecimiento y supervivencia de las plántulas, lo que sería de especial interés en el caso del olivo por su extensa fase juvenil. En general, los esfuerzos para aislar y caracterizar a representantes de estos géneros serían cruciales no sólo para descifrar su papel en la estructuración de la comunidad

microbiana de este órgano, sino también para identificar posibles aplicaciones biotecnológicas en la agricultura desde las primeras etapas del desarrollo de la planta.

Según nuestros resultados, el genotipo determinó fuertemente tanto las comunidades bacterianas como fúngicas de las semillas de olivo. Además, la agrupación de genotipos basada en los clústeres genéticos propuestos por Díez y colaboradores (2015) también explicó un gran porcentaje de variabilidad, pero sólo para la comunidad bacteriana (12 %). Estos pools genéticos se basan en la secuenciación de ADN microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR). Así pues, la variabilidad explicada por este agrupamiento está estrechamente relacionada con la variabilidad genética entre genotipos. En este sentido, la importancia del genotipo como factor influyente en la composición de la comunidad microbiana ha sido subrayada en diferentes compartimentos/órganos del olivo. De hecho, Müller y colaboradores (2015) describieron una mayor influencia del genotipo del olivo en comparación a las condiciones edafoclimáticas en las comunidades bacterianas y de arqueas de hojas de olivo. Estos resultados fueron confirmados por Malacrino y colaboradores (2022) para hojas, suelo y frutos de olivo. La importancia del genotipo también se ha demostrado para las raíces y savia del xilema (Anguita-Maeso et al., 2020; Fernández-González et al., 2019).

Otro detalle interesante que merece ser discutido se relaciona con las fuentes de las que procede el microbioma de la semilla de olivo y cuál podría ser su destino (o el de algunos de sus constituyentes) en relación con posibles eventos de transmisión vertical. Estas fuentes incluyen endófitos que habitan en compartimentos de la planta como las raíces, las flores o la savia del xilema, así como los microorganismos transportados por polinizadores y gametofitos, o presentes en el entorno circundante (Abdelfattah et al., 2022). En cuanto al olivo, varios estudios se han centrado en la descripción de las comunidades microbianas que se encuentran en los órganos fuente, como la carposfera, las flores, la filosfera y la savia xilemática (Abdelfattah et al., 2015; Malacrino et al., 2022). En este contexto, el polen podría desempeñar un papel relevante en la transmisión de microorganismos al pistilo y, posteriormente, a la semilla. Sin embargo, hay una notable ausencia de pruebas experimentales de este proceso tanto en olivos como en otras especies vegetales (Abdelfattah et al., 2022). Concretamente, en el caso

del olivo, la composición microbiana del polen aún no ha sido documentada. Dado que la mayoría de los genotipos del olivo presentan autoincompatibilidad (Breton & Bervillé, 2012) sería importante en futuros esfuerzos de investigación considerar cómo este hecho podría influir en la diversidad microbiana presente en las semillas de olivo (Abdelfattah et al., 2022).

Cabe destacar que nuestros resultados proporcionan la primera aproximación para identificar una de las fuentes potenciales de las que puede proceder el microbioma de las semillas de olivo, o al menos parte de él. Así, hemos podido determinar una serie de géneros compartidos entre la endosfera de la raíz y las semillas producidas en el mismo árbol. Este microbioma compartido incluye principalmente miembros de *Actinobacteria* (*Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*) y sólo un género de *Proteobacteria* (*Sphingomonas*). Una vez más, se destacó la importancia de *Streptomyces*, no sólo como género muy abundante y prevalente en las semillas, sino también en la endosfera de la raíz. Además, tanto las cepas de *Nocardia* como las de *Micromonospora* han mostrado potencial para promover el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos (Alotaibi et al., 2022; Nouioui et al., 2022; Trujillo et al., 2015). Además, muchas especies de *Nocardia* producen antibióticos, lo que podría desempeñar un papel en la protección de las semillas (Nouioui et al., 2022). Cabe mencionar que *Sphingomonas* estaba presente tanto en las semillas como en la endosfera de las raíces de genotipos descritos como tolerantes a *Verticillium dahliae* (Frantoio y Uslu) (Serrano et al., 2023), lo que puede sugerir un papel de esta bacteria en la lucha frente a un patógeno altamente relevante para el olivar. Un estudio previo de nuestro grupo de investigación ha demostrado la mayor abundancia relativa de este género en la endosfera de la raíz de plantas del cultivar Frantoio en contraste con un genotipo susceptible a *V. dahliae*, concretamente el cultivar Picual (Fernández-González, Cardoni, et al., 2020). Además, los miembros de *Sphingomonas* también son conocidos por su capacidad para degradar contaminantes y conferir protección contra patógenos (Leys et al., 2004; Sørensen et al., 2001). Aunque todavía se necesitan pruebas experimentales para demostrar la migración de algunos microorganismos beneficiosos de las raíces del olivo a las semillas, ya se ha demostrado que los microorganismos pueden desplazarse de la raíz a las hojas a través del sistema vascular (Chi et al., 2005;

López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Además, el movimiento de microorganismos de las semillas a las raíces se ha descrito anteriormente.

En cambio, algunos ASVs se encontraron únicamente en las muestras de semillas, pero no en las de endorrizosfera aquí estudiadas. El ASV específico de la semilla de olivo más abundante perteneció al género *Stenotrophomonas*, un taxón bien conocido por la promoción del crecimiento de las plantas y su capacidad de biocontrol frente a patógenos (Ryan et al., 2009). Otros ASVs específicos de semilla también pertenecieron a géneros caracterizados por mostrar funciones beneficiosas para la planta, como *Micromonospora* (Trujillo et al., 2015). Por lo tanto, estos resultados podrían apuntar a que algunos de los microorganismos beneficiosos presentes en las semillas de olivo podrían provenir de otros compartimentos vegetales diferentes a la raíz. Sin embargo, estos resultados están sujetos a la profundidad de secuenciación conseguida en este estudio, remarcando la necesidad de futuras investigaciones para elucidar su origen.

En general, nuestros hallazgos constituyen el punto de partida para nuevos conocimientos sobre el origen de los diversos componentes del microbioma de la semilla de olivo aquí identificados, sobre la posibilidad de que este microbioma (o parte de él) pueda heredarse a la descendencia, y sobre su posible papel en la germinación de la semilla y en favorecer el crecimiento y la tolerancia al estrés en las primeras etapas del desarrollo de la plántula.

A modo de conclusión, el presente estudio desvela por primera vez la composición de la microbiota de las semillas de olivo. Esta comunidad microbiana presenta características distintivas en comparación con otras especies vegetales. *Malassezia* se identificó como el género fúngico más abundante y prevalente en las semillas de olivo, lo que contrasta con lo observado hasta ahora en otras especies vegetales. En particular, ciertos taxones que mostraron una alta abundancia relativa y prevalencia en las semillas también han sido ampliamente documentados en otros órganos del olivo (tales como *Cladosporium* y *Streptomyces*). Esta aparente colonización sistémica del hospedador subraya la importancia de estos taxones para el desarrollo y la salud del holobionte olivo, y sugiere que podrían ser reclutados favorablemente por la planta. Además, según nuestros resultados, el género *Streptomyces* destaca por su posible papel en la estructuración de la microbiota de las semillas de olivo, debido a la

relación entre su abundancia relativa y la agrupación de genotipos encontrada en el análisis de diversidad  $\beta$ , un hecho especialmente interesante por los conocidos rasgos beneficiosos para la salud vegetal de las bacterias de este género. Este estudio también aporta nueva información sobre la influencia que el genotipo del olivo ejerce sobre las comunidades bacterianas y fúngicas de las semillas, en línea con estudios previos centrados en otros órganos de esta especie arbórea. A pesar de esto, e independientemente del pool genético o de la procedencia geográfica de los genotipos de olivo aquí analizados, se identificó un microbioma compartido. Esta comunidad microbiana común incluía géneros como *Streptomyces* y *Malassezia*. Además, estos géneros estuvieron presentes tanto en raíces como en semillas, sugiriendo una posible migración de estos microorganismos desde las raíces a la parte aérea. Futuros estudios deberían centrarse en la identificación, aislamiento y caracterización de los microorganismos endófitos clave de la semilla del olivo, de manera que se incrementen los conocimientos sobre sus funciones en los procesos mencionados. Además, esto permitiría evaluar su potencial agrobiotecnológico como bioindicadores en los programas de mejora genética del olivo y como agentes que contribuyen a la tolerancia de los genotipos de olivo frente a los factores de estrés a/bióticos que afectan a su cultivo.

# **CAPÍTULO V**



## CAPÍTULO V. Aislamiento e identificación de bacterias colonizadoras de la endosfera de olivo.

### V.1. INTRODUCCIÓN

Existe un creciente interés sobre la estrecha relación entre agricultura y cambio climático. Cada vez más, se busca la implementación de prácticas agrícolas con un mínimo impacto en el medio ambiente, lo que a su vez suele relacionarse con cultivos más resilientes al cambio climático (European Commission, 2020). El calentamiento global trae consigo fenómenos climáticos extremos, como las olas de calor experimentadas en el verano de 2022 en España, que se han visto acompañadas de una sequía generalizada (Serrano-Notivoli et al., 2023). Estos eventos climáticos tienen un impacto significativo en la producción agrícola, siendo destacable el caso del olivar, donde la escasez de lluvias ha ocasionado una drástica disminución en la producción de frutos y en el contenido en aceite de los mismos (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, 2023; NASA Earth Observatory, 2023). En este sentido, las prácticas de agricultura convencionales contribuyen a agravar esta situación, tanto por el impacto que generan en el clima (por ejemplo, por el aumento en la emisión de óxidos de nitrógeno del suelo por un exceso de fertilización nitrogenada) como por reducir la resiliencia del ecosistema a condiciones climáticas adversas (Celik et al., 2010; Crystal-Ornelas et al., 2021; Lal, 2010; Piñeiro et al., 2020).

De esta manera, surge la necesidad de emplear prácticas agrícolas más sostenibles pero que permitan seguir obteniendo un buen rendimiento en la producción. Así, el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs, del inglés, *plant growth promoting microorganisms*) supone una alternativa sostenible para el aumento de la biomasa vegetal y mejora en la respuesta a estreses abióticos y bióticos (Oleńska et al., 2020; B. K. Singh et al., 2020; J. S. Singh et al., 2011). Estos beneficios se consiguen por diversos mecanismos, como pueden ser la solubilización o quelación de nutrientes del suelo, la síntesis o regulación de la síntesis de fitohormonas o la modulación de la respuesta sistémica frente a ataques de patógenos, entre otros (Oleńska et al., 2020; B. K. Singh et al., 2020). Estos

microorganismos pueden encontrarse tanto en el suelo como colonizando el interior (endosfera) o la superficie de tejidos vegetales (rizoplana, rizosfera o filosfera) (Oleńska et al., 2020).

Dentro de los taxones bacterianos con funciones beneficiosas para la planta, las actinobacterias constituyen un grupo de gran interés por su alta producción de metabolitos secundarios. De hecho, dos tercios de los antibióticos usados hoy en día son producidos por actinobacterias y más de 7.000 metabolitos secundarios han sido descritos solo para especies del género *Streptomyces* (Raaijmakers & Mazzola, 2012; van Bergeijk et al., 2020). Los antibióticos no sólo participan inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos, sino que, en concentraciones subinhibitorias, modulan la transcripción de genes, virulencia, motilidad y formación de biofilms (Raaijmakers & Mazzola, 2012). De esta manera, las actinobacterias son prometedoras a nivel biotecnológico por su antibiosis frente a fitopatógenos, lo que se ha demostrado tanto en su uso como bioinoculantes como en su presencia en suelos con propiedades supresoras de enfermedades vegetales (Raaijmakers & Mazzola, 2012; Seipke et al., 2012; van der Meij et al., 2017; Vurukonda et al., 2018). Además de su capacidad de antibiosis, las actinobacterias producen beneficios en la planta a través de muchos otros mecanismos, como la producción de sideróforos, fijación de nitrógeno (especies de los géneros *Frankia* y *Micromonospora*), activación de la resistencia sistémica inducida o producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) (van der Meij et al., 2017). Todo esto ha llevado a la comercialización de varias cepas tanto para mejorar la nutrición vegetal como para el biocontrol de patógenos (Viaene et al., 2016).

En este sentido, las actinobacterias han mostrado una especial relevancia para el caso del olivar, al ser el phylum más abundante tanto en la endosfera radicular de olivos crecidos en la colección mundial de germoplasma de olivo (WOGC, en el IFAPA de Córdoba, Fernández-González et al., 2019), en olivos del cultivar Picual bajo diferentes condiciones agronómicas (descrito en el capítulo III de esta Tesis Doctoral, (Wentzien et al., 2023), así como en las semillas de diferentes genotipos (véase el capítulo IV) (Fernández-González et al., 2019; Wentzien et al., 2023). Dentro del phylum *Actinobacteria*, el género *Actinophytocola* fue el más abundante en diversos estudios de nuestro grupo de investigación sobre la endosfera radicular del olivo (Fernández-

González et al., 2019; Wentzien et al., 2023). En este sentido, diversos estudios apuntan al potencial de *Actinophytocola* en la producción de metabolitos secundarios. Bouznada y colaboradores (2016) describieron la capacidad de aislados de *Actinophytocola* de ejercer actividades antimicrobianas. Además, se ha demostrado la correlación entre la abundancia de *Actinophytocola* y la expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógenos en la raíz del olivo (Fernández-González et al., 2021). Sin embargo, para la completa comprensión del papel de algunos miembros del género *Actinophytocola* en las comunidades microbianas colonizadoras del olivo es necesaria la obtención de aislados. Esto permitiría la realización de estudios sobre sus actividades promotoras del crecimiento vegetal y antagonismo frente a fitopatógenos del olivar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Con todo lo mencionado, se planteó el objetivo de obtener aislados del género *Actinophytocola*, con la intención de aumentar el conocimiento sobre uno de los taxones predominantes en la endosfera radicular del olivo. Además, debido a que las raíces de olivo suponen un reservorio poco estudiado de potenciales PGPMs, se planteó el almacenamiento a largo plazo de aquellos aislados que pertenecieran a otros géneros con potencial actividad promotora del crecimiento vegetal.

## V.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de aislar algún miembro perteneciente al género *Actinophytocola* de la endosfera radicular de olivo, se siguieron varias aproximaciones. En primer lugar, se seleccionaron muestras de raíz de diferentes genotipos de olivo en los que se identificó una gran abundancia relativa del género *Actinophytocola* según los resultados de Fernández-González y colaboradores (2019). Tras la esterilización superficial de las raíces, estas fueron molidas en un mortero estéril con 10 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. De los extractos obtenidos se sembraron 6 diluciones en tres medios diferentes (SCA, HH' y SCA'), a los que se adicionaron los antibióticos cicloheximida y ácido nalidíxico (ver Apartado M.7.2.1). Además, también se realizaron asilamientos a partir de muestras de raíz del genotipo Verdial de Vélez Málaga aplicando un tratamiento con cloroformo para seleccionar aquellas cepas con resistencia a desecación. Las siembras se realizaron en

medios SCA y TSA, suplementados con cicloheximida. Además, las muestras pretratadas con cloroformo fueron utilizadas para aplicar una serie de tratamientos destinados al aislamiento de géneros de actinobacterias que no suelen crecer por los métodos convencionales. Para la aplicación de estos tratamientos, también se utilizaron muestras del genotipo Mavreya de olivo, aplicando a una parte de la muestra el pretratamiento con cloroformo, previo a los demás tratamientos. Se utilizó un tratamiento con SDS y extracto de levadura para promover la germinación de esporas de actinobacterias e inhibición del crecimiento de miembros del género *Bacillus*. Por otro lado, se utilizó un tratamiento de rehidratación y centrifugación para retener esporas móviles y siembra en placa con filtros de nitrocelulosa para promover el aislamiento de bacterias formadoras de micelio, como es el caso de *Actinophytocola*.

Una de las problemáticas encontradas fue la aparición de bacterias de rápido crecimiento, que podrían estar impidiendo el aislamiento de bacterias del género *Actinophytocola*, ya que estas se ha observado que son de crecimiento lento. De esta manera, se utilizó un medio oligotrófico que ralentizara el crecimiento bacteriano, facilitando la identificación de bacterias de lento crecimiento. Para este aislamiento, se utilizaron muestras ya pretratadas con cloroformo del genotipo Verdial de Vélez Málaga y se sembraron en medio NA a diferentes diluciones (10, 50 y 100 veces diluido de su concentración original).

Otra de las aproximaciones que se llevó a cabo fue la utilización de un *screening* de un alto número de aislados. Para ello, se utilizaron muestras de olivo del genotipo Uslu, que fue el que presentó la mayor abundancia relativa de *Actinophytocola*. Se sembraron un alto número de placas (6 diluciones con 10 réplicas por dilución) en medio SCA suplementado con cicloheximida y ácido nalidíxico. A partir del crecimiento bacteriano en estas placas, se utilizaron palillos estériles para repicar 1.000 colonias en placas máster (ordenadas y numeradas). Se llevaron a cabo PCRs de colonia mezclando en un mismo tubo 10 colonias, con primers específicos para el género *Actinophytocola*, con el fin de detectar la presencia de bacterias de este género por amplificación del gen *16S rRNA* mediante visualización en un gel de agarosa al 0,8 %.

Con el objeto de realizar otras aproximaciones de aislamiento, se utilizaron muestras del genotipo Picual muestreadas en la localidad de Otura, Granada. Con estas

raíces esterilizadas superficialmente se llevaron a cabo varios tipos de aislamiento. Así, se trituró una cantidad suficiente de raíz para su adición a varios medios de cultivo, con el objeto de mimetizar las condiciones nutricionales originales de las bacterias endofíticas de la raíz del olivo. Los medios fueron ISP-2, WA y TSA. En estos medios se sembraron 4 diluciones con tres réplicas, utilizando 50 µL de extracto de raíz. Además, también se llevó a cabo un ensayo de desecación en campana de flujo laminar durante 24 horas para su posterior sembrado en estos medios.

Con las muestras del genotipo Picual, también se llevó a cabo un ensayo de aislamiento utilizando raíces preenriquecidas, un tratamiento que permite activar el crecimiento de endófitos radiculares antes del sembrado. En este sentido, las muestras preenriquecidas fueron sometidas a diferentes combinaciones de tratamientos para evaluar la eficacia de los mismos. Durante el proceso, se tomaron alícuotas para la realización de PCR con primers específicos de *Actinophytocola*, con el objeto de sembrar sólo aquellas combinaciones donde se detectase amplificación.

Debido a los esfuerzos de aislamiento realizados, resultaba de interés poder almacenar otros aislados pertenecientes a géneros con potencial en la promoción del crecimiento vegetal y en el biocontrol de fitopatógenos que previamente habían sido detectados como de alta abundancia en la endosfera de la raíz de olivo. Así, durante los diferentes experimentos realizados, se identificaron mediante secuenciación Sanger del gen *16S rRNA* diversos aislados para su almacenamiento a largo plazo en criotubos a -80 °C. Por otro lado, con este mismo objetivo, y dada la detección de bacterias del orden *Rhizobiales* en nuestros trabajos previos, se realizaron experimentos con planta trampa para obtener aislados de este orden de Proteobacteria. Estos experimentos consistieron en la inoculación de semillas esterilizadas de diferentes leguminosas con extracto de raíces muestreadas de la WOGC. Tras esto, se aislaron las bacterias colonizadoras de los nódulos formados, que teóricamente deberían provenir del inóculo aplicado. Para esto se utilizaron semillas de *Medicago sativa* L. 'Victoria', *Pisum sativum* L. 'Partim' y *Phaseolus vulgaris* F-15. Para los géneros seleccionados para su almacenamiento, se llevó a cabo secuenciación del gen *16S rRNA* mediante secuenciación Sanger y se realizaron árboles filogenéticos utilizando las herramientas MAFFT y phyML integradas como extensiones en el software Geneious Prime.

### V.3. RESULTADOS

Los métodos descritos en el Apartado M.7 fueron diseñados con el objetivo de aislar bacterias del género *Actinophytocola*. Si bien se llevaron a cabo múltiples técnicas, ninguno de los métodos resultó efectivo para dicho objetivo, bajo las condiciones de estudio aquí presentadas. Sin embargo, se consiguieron aislar miembros de otros géneros bacterianos de interés, tanto por sus potenciales beneficios para la salud vegetal, como por su alta abundancia en la endosfera radicular del olivo. A continuación, se expondrán los resultados obtenidos y las problemáticas encontradas con los diferentes métodos empleados.

#### V.3.1. Aislamiento a partir de raíces tomadas de la WOGC

El primer método de aislamiento empleado consistió en el sembrado de muestras tomadas de diferentes genotipos de olivo de la WOGC. A partir de estas muestras, se obtuvieron extractos de las raíces previamente esterilizadas superficialmente, con el objeto de aislar microorganismos provenientes de la endosfera de la raíz. A partir de las placas sembradas, las colonias que presentaban diferentes morfologías fueron transferidas a placas máster. Tras su crecimiento, se realizó PCR de colonia y secuenciación del gen *16S rRNA* mediante la técnica de Sanger. En total, se secuenciaron 94 aislados de los cuales 72 se pudieron identificar a nivel de género. Los resultados se muestran en la Tabla V.1.

**Tabla V.1. Se muestra el número de aislados obtenidos a partir de la endosfera de raíz de olivo y su clasificación a nivel de género, según lo obtenido por el análisis de la secuencia del gen *16S rRNA* generada con la técnica de secuenciación Sanger.**

Géneros bacterianos	Número de aislados
<i>Kocuria</i> spp.	11
<i>Gordonia</i> spp.	2
<i>Nocardiopsis</i> spp.	4
<i>Streptomyces</i> spp.	1
<i>Micrococcus</i> spp.	20
<i>Methylobacterium</i> spp.	1
<i>Staphylococcus</i> spp.	7
<i>Curtobacterium</i> spp.	4
<i>Microbacterium</i> spp.	5
<i>Pseudomonas</i> spp.	2
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	13
<i>Sphingomonas</i> spp.	1
<i>Arthrobacter</i> spp.	1

Como se puede observar, aparecieron géneros gramnegativos, a pesar de la presencia en el medio de cultivo del antibiótico ácido nalidíxico. Debido a ello, en los siguientes aislamientos se aumentó su concentración de 10 a 50 µg/mL.

### V.3.2. Desección con cloroformo.

Por otra parte, se realizó un aislamiento a partir de raíz del genotipo Verdial de Vélez-Málaga realizando un aislamiento selectivo de bacterias resistentes a desecación, utilizando el cloroformo como agente selectivo. En este aislamiento, se analizaron 25 aislados mediante secuenciación Sanger del gen *16S rRNA*. De estos aislados, 15 pertenecieron al género *Bacillus*, y 10 a *Streptomyces*.

### **V.3.3. Tratamientos, siembra con filtros de nitrocelulosa y crecimiento oligotrófico.**

Otro de los métodos de aislamiento consistió en la aplicación de una serie de tratamientos a las muestras, que pudieran restringir el crecimiento de otros géneros de más rápido crecimiento. Así, estos tratamientos se realizaron sobre las raíces de los genotipos Verdial de Vélez-Málaga y Mavreya, pretratadas con cloroformo, así como un control sin cloroformo. Los tratamientos consistieron en (i) la aplicación de SDS (0,05 %) y extracto de levadura (6 %), (ii) rehidratación y centrifugación y (iii) siembra en filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{M}$ . En todos los casos, el crecimiento microbiano fue escaso. De estos tratamientos, se analizaron un total de 30 aislados. Debido a la emergencia ocasionada por la pandemia de COVID-19, sólo se pudo comenzar la secuenciación de 8 de estos aislados, que pertenecieron a los géneros *Streptomyces* (5 aislados), *Micrococcus* (2 aislados) y *Nocardia* (1 aislado).

Además, también se sembraron muestras de Verdial de Vélez-Málaga pretratadas con cloroformo en medios de crecimiento oligotróficos. Como cabría esperar, se obtuvo poco crecimiento con colonias de morfología muy similar, por lo que se analizaron tres de estas colonias que pertenecieron al género *Methylobacterium*.

### **V.3.4. Screening masivo mediante PCR**

El *screening* realizado con primers específicos del género *Actinophytocola* se llevó a cabo sobre colonias crecidas a partir de extracto de raíz del genotipo Uslu, el cual presentó una alta abundancia relativa de *Actinophytocola* en la endosfera radicular según Fernández-González y colaboradores (2019). La identificación mediante PCR no devolvió ningún resultado positivo, es decir, no se observó ninguna banda de amplificación en el gel de agarosa. Para asegurar que este resultado no se debió a la imposibilidad de extraer el ADN de las células, se realizó paralelamente una PCR con primers universales del gen *16S rRNA* que devolvió resultados positivos, confirmando la presencia de ADN bacteriano en los aislados.

### V.3.5. Aislamiento desde raíces de Picual

El aislamiento a partir de extracto de raíces del genotipo Picual (obtenidas de una finca ecológica sin riego en Otura, Granada) llevó a la obtención de 107 aislados. Estos se obtuvieron a partir de dos medios de cultivo diferentes (ISP-2 y WA, con o sin extracto de raíz en su medio) y de un ensayo de desecación de la raíz durante 24 horas en campana de flujo laminar. A continuación, se detallan los géneros a los que pertenecieron los aislados obtenidos según cada medio y tratamiento en la Tabla V.2.

**Tabla V.2. Se muestra el número de aislados obtenidos a partir de la endosfera de raíz de olivos del genotipo Picual**, en medios de cultivo enriquecidos con extracto de raíz, así como en medio TSA en el que se utilizó para la siembra raíces previamente sometidas a desecación durante 24 h. Se muestra la clasificación a nivel de género resultante por el análisis de la secuencia del gen *16S rRNA* generada con la técnica de secuenciación Sanger. ISP-2C: medio ISP-2 enriquecido con extracto crudo de raíz, ISP-2F: medio ISP-2 enriquecido con extracto filtrado de raíz, WAC: medio wáter agar con extracto crudo de raíz, WAF: medio wáter agar con extracto filtrado de raíz, TSA: medio TSA donde se sembraron raíces tratadas con desecación al aire durante 24 h.

Géneros bacterianos	Número de aislados por medio de cultivo				
	ISP-2C	ISP-2F	WAC	WAF	TSA
<i>Streptomyces</i> spp.	11	12	6	13	10
<i>Nocardia</i> spp.	8	5	9	3	-
<i>Promicromonospora</i> spp.	4	5	3	1	-
<i>Microbacterium</i> spp.	2	-	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> spp.	1	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus</i> spp.	1	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i> spp.	-	-	-	-	4
<i>Devosia</i> spp.	-	-	-	-	1

### V.3.6. Aislamiento a partir de raíces pre-enriquecidas

Muestras de raíz del genotipo Picual obtenidas en Otura (Granada) fueron sometidas a preenriquecimiento y posteriores tratamientos. Estos incluyeron un tratamiento de desecación durante 24 horas y un tratamiento con SDS y extracto de levadura. Se realizaron todas las combinaciones posibles entre estas condiciones, de manera que pudiera probarse el efecto de cada tratamiento y sus combinaciones. En diferentes puntos del procedimiento se tomaron alícuotas de las cuales se extrajo ADN y se hizo PCR con primers específicos de *Actinophytocola*. El producto fue visualizado en un gel de agarosa y se observó una banda positiva en las muestras desecadas a 70 °C y con posterior tratamiento con SDS y extracto de levadura. Así, a partir de esta muestra se llevaron a cabo aislamientos tanto en placa por estrías como sembrando gotas de 10 µL de la dilución 10<sup>-3</sup>. Desafortunadamente, y a pesar del resultado obtenido en el gel de agarosa, no se aisló ningún miembro del género *Actinophytocola*. No obstante, se obtuvieron 6 aislados del género *Paenibacillus*.

### V.3.7. Experimentos de planta trampa

Por último, de los ensayos de plantas trampa se consiguió el aislamiento de miembros del género *Rhizobium* a partir de los nódulos de plantas de guisante inoculadas con extracto de raíz del genotipo Uslu. Así, se obtuvieron 14 aislados de dicho género. Si bien también se realizó un ensayo con plantas de judía, estas no crecieron adecuadamente y no se pudieron obtener nódulos.

### V.3.8. Almacenamiento y caracterización de aislados de interés

A partir de los aislados mencionados en los apartados anteriores, se realizó una selección de los mismos para su almacenamiento a largo plazo en criotubos con glicerol 25 % a – 80 °C. Esta selección se basó en lo descrito anteriormente por Fernández-González y colaboradores (2019) en cuanto a la composición microbiana de la endosfera

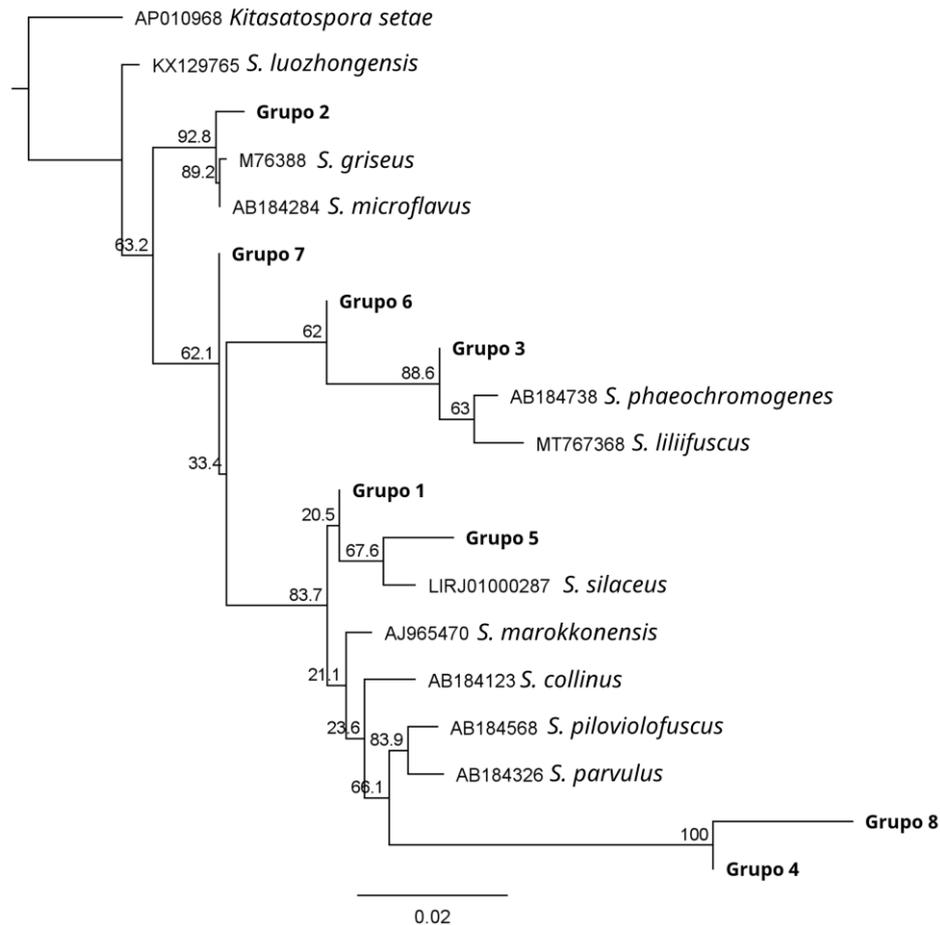
de olivos procedentes del WOGC. En concreto, los géneros más abundantes según este estudio fueron:

- Actinophytocola
- Streptomyces
- Pseudonocardia
- Bradyrhizobium
- Ensifer
- Rhizobium.

Así, se seleccionaron aquellos aislados con un número suficiente de representantes (más de cinco) y que habían sido identificados como muy abundantes en la endosfera. Esto resultó en el almacenamiento de 53 aislados del género *Streptomyces* y 14 del género *Rhizobium*. Además, también se llevó a cabo el almacenamiento de otros géneros del phylum *Actinobacteria* por su potencial interés en la salud de la planta. Estos fueron *Kocuria* (7 aislados) y *Nocardia* (19 aislados). Por último, también se consideró de interés el almacenamiento de los aislados del género *Paenibacillus* (6 aislados), debido a su conocido papel en el biocontrol de plagas en el olivar (Markakis et al., 2016). En cuanto a los aislados del género *Bradyrhizobium*, estos no fueron considerados para posteriores análisis por problemas de contaminación en su almacenamiento.

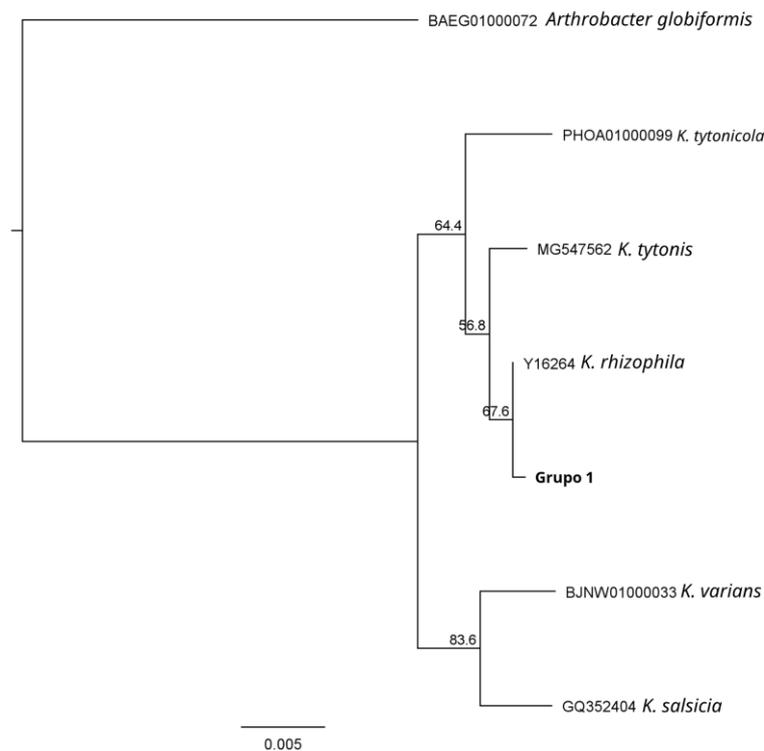
Los aislados almacenados a largo plazo fueron sometidos a extracción de ADN genómico, así como a la secuenciación del gen *16S rRNA* por ambos extremos (primers 9bfm y 1512UR). Estas secuencias fueron procesadas según lo descrito en el apartado M.5.1 y se realizó su alineamiento para inferir de manera preliminar la diversidad de nuestros aislados en base a las diferencias en sus secuencias del gen *16S rRNA*. Aquellos aislados cuyas secuencias eran 100 % idénticas fueron agrupados y la secuencia en común se utilizó para realizar un árbol filogenético de los mismos. Para el caso de *Streptomyces*, se secuenció el gen *16S rRNA* para las 53 cepas seleccionadas. Estas se diferenciaron en 8 grupos según su secuencia, siendo el grupo 1 el más representado, incluyendo las secuencias de 40 aislados. Tras el alineamiento con las cepas tipo más próximas, las secuencias quedaron con una longitud de 1.215 pb y estas fueron usadas

para la construcción del árbol filogenético (Figura V.1). Se puede observar que ningún grupo tiene un porcentaje de similitud del 100 % con alguna de las cepas tipo incluidas. En concreto, para el grupo 1 la cepa tipo filogenéticamente más cercana fue *Streptomyces marokkonensis* Ap1 (T) con un porcentaje de identidad de secuencia del 99,26 %. En el caso del grupo 2, fue *Streptomyces microflavus* NBRC 13062 (T) con un porcentaje de identidad del 99,59 %. El grupo 3 presentó un porcentaje de identidad del 99,09 % frente a la cepa tipo *Streptomyces phaechromogenes* NBRC 3180 (T) y el grupo 5 mostró un 98,60 % de identidad con *Streptomyces silaceus* NRRL B-24166 (T). Por su parte, tanto el grupo 4 como el grupo 8 no presentaron una alta similitud con ninguna de las cepas tipo, teniendo una mayor similitud entre ellos, con un porcentaje de identidad de 98,17 %. Algo similar ocurrió con el grupo 7, que mostró la mayor identidad con el grupo 6 (98,43 %). El grupo 6 se emparentó más próximamente con la secuencia del gen *16S rRNA* del grupo 3 (98,52 % de identidad).



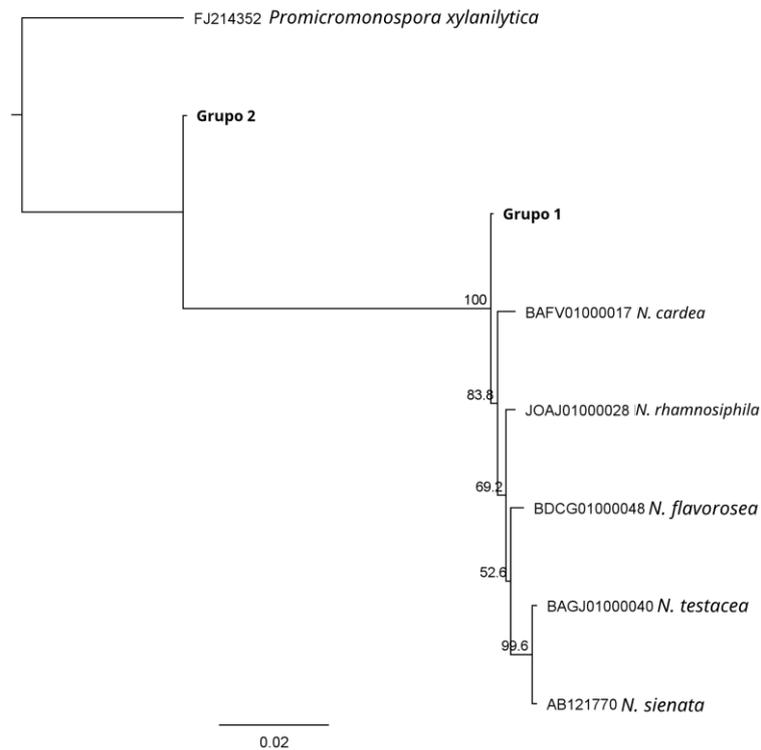
**Figura V.1. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como *Streptomyces* spp.** Se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo *maximum likelihood* implementado en Geneious en la extensión phyML. Se incluyeron las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de raíz de olivo (indicadas como grupos, incluyendo todas las secuencias idénticas) así como de diversas cepas tipo descritas para el género *Streptomyces* spp. Para las cepas tipo, se muestra el número de acceso a la base de datos de GenBank seguido del nombre de la especie. El árbol se realizó con 1.000 permutaciones (bootstrap) y los valores de bootstrap obtenidos se muestran en cada nodo. La barra inferior muestra las sustituciones cada 1.000 nucleótidos, en este caso, 20 cada 1.000. El árbol se encuentra enraizado en un grupo externo, elegido por pertenecer a otra familia dentro del mismo phylum (*Kitasatospora setae*).

Para el caso de los aislados clasificados a nivel de género como *Kocuria* spp, las secuencias obtenidas para el gen *16S rRNA* presentaron un 100 % de identidad entre todos los aislados. Por ello, se muestra un único grupo en el árbol filogenético correspondiente (Figura V.2), cuya longitud de secuencia fue de 1.392 pb. La cepa tipo más cercana filogenéticamente a los aislados corresponde con la especie *Kocuria rhizophila* A68 (T), representando un 99,93 % de identidad.



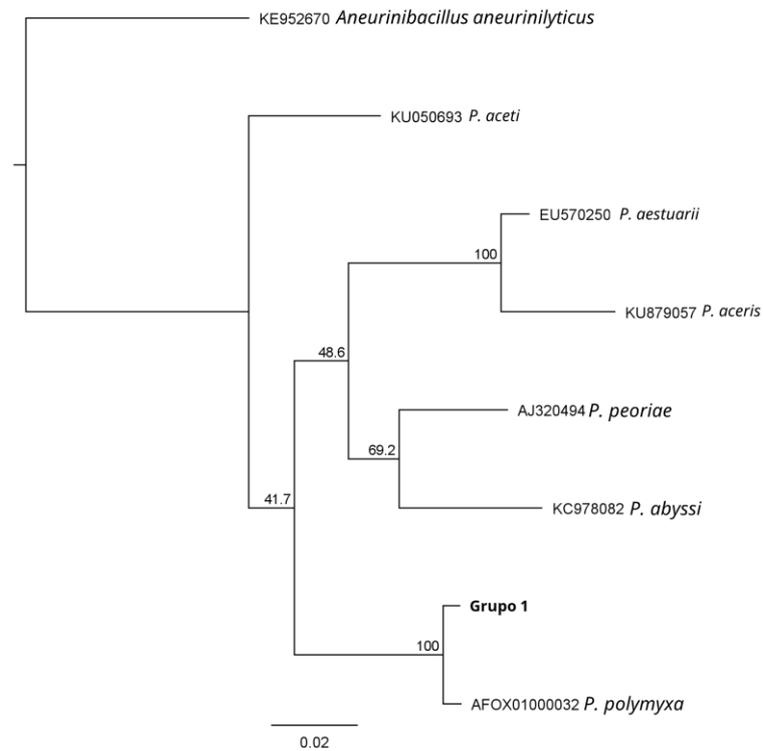
**Figura V.2. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como *Kocuria* spp.** Se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo maximum likelihood implementado en Geneious en la extensión phyML. Se incluyeron las secuencias del gen *16S rRNA* de las cepas aisladas de raíz de olivo (indicadas como grupos, incluyendo todas las secuencias idénticas) así como de diversas cepas tipo descritas para el género *Kocuria* spp. Para las cepas tipo, se muestra el número de acceso a la base de datos de GenBank seguido del nombre de la especie. El árbol se realizó con 1.000 permutaciones (bootstrap) y los valores de bootstrap obtenidos se muestran en cada nodo. La barra inferior muestra las sustituciones cada 1000 nucleótidos, en este caso, 5 cada 1.000. El árbol se encuentra enraizado en un grupo externo, elegido por pertenecer a otro género de la misma familia (*Arthrobacter globiformis*).

Las cepas obtenidas de raíz de olivo clasificadas a nivel de género como *Nocardia* spp. se incluyeron en dos grupos según su similitud en la secuencia del gen *16S rRNA*. El grupo 1 fue el más representado, incluyendo la secuencia de 18 aislados, frente a la de un único aislado del grupo 2. Estas secuencias, junto con las de las cepas tipo más próximas filogenéticamente, se utilizaron para obtener el árbol filogenético mostrado en la Figura V.3, con una longitud de 1.278 pb. Cabe destacar que la secuencia del grupo 2 se encontró muy cercana filogenéticamente al género *Promicromonospora*, con una identidad de secuencia del 94,21 % con el gen *16S rRNA* de la cepa tipo *Promicromonospora xylanilytica* YIM 61515 (T), si bien el porcentaje de identidad con la cepa tipo *Nocardia flavorosea* NBRC 108225 (T) fue muy similar (94,20 %). Esta fue la cepa tipo con la que mostró un mayor porcentaje de similitud el grupo 1, en concreto, un 99,61 %. A pesar de estos resultados, el árbol filogenético obtenido (Figura V.3) muestra a *N. cardea* como la cepa tipo más próxima filogenéticamente al grupo 1, lo que puede ser debido a los bajos valores de *bootstrapping* obtenidos para *N. cardea*, *N. rhamnosiphila* y *N. flavorosea*.



**Figura V.3. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como *Nocardia* spp.** Se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo maximum likelihood implementado en Geneious en la extensión phyML. Se incluyeron las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de raíz de olivo (indicadas como grupos, incluyendo todas las secuencias idénticas) así como de diversas cepas tipo descritas para el género *Nocardia* spp. Para las cepas tipo, se muestra el número de acceso a la base de datos de GenBank seguido del nombre de la especie. El árbol se realizó con 1.000 permutaciones (bootstrap) y los valores de bootstrap obtenidos se muestran en cada nodo. La barra inferior muestra las sustituciones cada 1000 nucleótidos, en este caso, 20 cada 1.000. El árbol se encuentra enraizado en un grupo externo, elegido por pertenecer a otra familia dentro del mismo phylum (*Promicromonospora xylanilytica*).

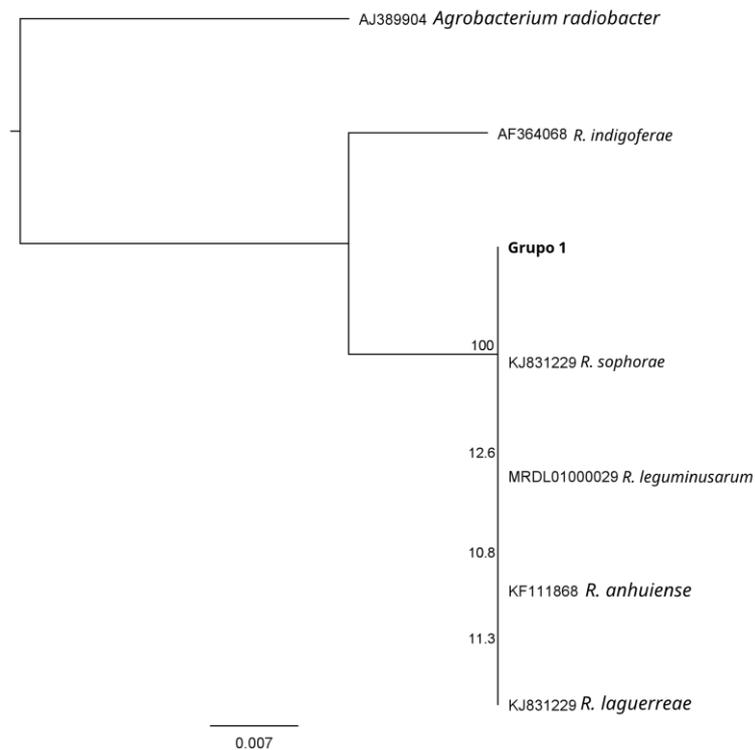
Por su parte, las seis cepas clasificadas como *Paenibacillus* spp. a nivel de género presentaron una secuencia del gen 16S rRNA idéntica, con una longitud final de 1.421 pb. La especie más próxima filogenéticamente fue *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842 (T) con una identidad de secuencia del 99,22 %. El árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura V.4.



**Figura V.4. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como *Paenibacillus* spp.** Se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo *maximum likelihood* implementado en Geneious en la extensión phyML. Se incluyeron las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de raíz de olivo (indicadas como grupos, incluyendo todas las secuencias idénticas) así como de diversas cepas tipo descritas para el género *Paenibacillus* spp. Para las cepas tipo, se muestra el número de acceso a la base de datos de GenBank seguido del nombre de la especie. El árbol se realizó con 1.000 permutaciones (bootstrap) y los valores de bootstrap obtenidos se muestran en cada nodo. La barra inferior muestra las sustituciones cada 1.000 nucleótidos, en este caso, 20 cada 1.000. El árbol se encuentra enraizado en un grupo externo, elegido por pertenecer a otra familia dentro del mismo phylum (*Aneurinibacillus aneurinilyticus*).

Por último, se obtuvo la secuencia del gen 16S rRNA para los 14 aislados clasificados como *Rhizobium* spp. a nivel de género. Estos presentaron una identidad de secuencia del 100 %, incluyéndose en un único grupo. La secuencia de este grupo presentó un 100 % de identidad con las secuencias de las especies *Rhizobium sophorae* CCBAU 03386 (T), *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370 (T), *Rhizobium anhuiense*

CCBAU 23252 (T) y *Rhizobium laguerreae* FB206 (T). El árbol filogenético obtenido se presenta en la Figura V.5.



**Figura V.5. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de aislados de endosfera de olivo clasificados a nivel de género como *Rhizobium* spp.** Se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo *maximum likelihood* implementado en Geneious en la extensión phyML. Se incluyeron las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de raíz de olivo (indicadas como grupos, incluyendo todas las secuencias idénticas) así como de diversas cepas tipo descritas para el género *Rhizobium* spp. Para las cepas tipo, se muestra el número de acceso a la base de datos de GenBank seguido del nombre de la especie. El árbol se realizó con 1.000 permutaciones (bootstrap) y los valores de bootstrap obtenidos se muestran en cada nodo. La barra inferior muestra las sustituciones cada 1.000 nucleótidos, en este caso, 7 cada 1.000. El árbol se encuentra enraizado en un grupo externo, elegido por pertenecer a otra familia dentro del mismo phylum (*Agrobacterium radiobacter*).

## V.4. DISCUSIÓN

Frente a la creciente preocupación por aumentar la producción agrícola con un mínimo impacto en el medio ambiente, el uso de bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPBs) se presenta como una solución sostenible para aumentar la biomasa vegetal y favorecer la resistencia de las plantas a diferentes estreses, tanto bióticos como abióticos (Bai et al., 2022; Compant et al., 2019; Trivedi et al., 2020). De esta manera, resulta de interés la búsqueda de nuevas fuentes para el aislamiento e identificación de PGPBs, como puede ser la endosfera radicular (Oleńska et al., 2020; B. K. Singh et al., 2020; J. S. Singh et al., 2011). En este sentido, los esfuerzos orientados al aislamiento e identificación de PGPBs han estado principalmente centrados en la rizosfera y suelo suelto, si bien el interés por las comunidades endófitas de la raíz está aumentando recientemente por su potencial en promover la salud de la planta (Bai et al., 2022; Compant et al., 2019; Trivedi et al., 2020). En concreto, varios endófitos radiculares del olivo han mostrado efectos prometedores contra patógenos de tanta importancia en el olivar como *Verticillium dahliae* Kleb. (Mercado-Blanco et al., 2004; Prieto et al., 2009). Así, en esta Tesis Doctoral se propuso la obtención de aislados de la endosfera radicular (endorrizosfera) del olivo, especialmente enfocado a la obtención de aislados del género *Actinophytocola* por su alta abundancia relativa, detectada en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Fernández-González et al., 2019; Wentzien et al., 2023).

Si bien se emplearon diferentes técnicas de aislamiento, algunas de ellas específicas para géneros de actinobacterias difíciles de cultivar en medios conocidos, no fue posible el aislamiento de ninguna colonia del género *Actinophytocola*. En este sentido, el uso de técnicas de secuenciación masiva ha aumentado exponencialmente el conocimiento de las comunidades bacterianas que habitan múltiples ecosistemas, pero un alto porcentaje de estas bacterias son difícilmente cultivables en laboratorio (Connon & Giovannoni, 2002). Existen múltiples factores que contribuyen a ello, como puede ser el requerimiento de factores de crecimiento específicos en el medio, las relaciones sintróficas con otros microorganismos, el lento crecimiento, así como la presencia de bacterias en estados de dormancia (Cross et al., 2019; Lewis et al., 2020; Podolich et al., 2015). En nuestro estudio, se emplearon diversas técnicas que

abordaron algunas de estas problemáticas. En este sentido, se utilizó un medio de cultivo suplementado con raíz secada y triturada, de manera que simulase las condiciones nutricionales originales en las que crecen los endófitos radiculares del olivo. Sin embargo, es posible que durante el procesamiento de la raíz y el autoclavado del medio, ciertos componentes hayan perdido su eficacia, como puede ser el caso de factores de crecimiento (Overmann, 2006). Por otro lado, también se emplearon medios de cultivo con bajo contenido en nutrientes, así como diversos pretratamientos que limitasen el aislamiento de bacterias de rápido crecimiento, permitiendo la identificación de otros aislados. Sin embargo, los resultados no fueron favorables para el aislamiento de *Actinophytocola*. Un inconveniente de las técnicas empleadas es que no permiten abarcar la diversidad microbiana presente en las muestras, lo que genera un gran componente estocástico en el aislamiento. Así, la aplicación de técnicas de culturómica podría ser de gran interés, ya que estas se basan en el uso de un alto número de medios de cultivo diferentes, donde se varían los sustratos utilizados, acoplados a métodos rápidos de identificación mediante secuenciación del gen *16S rRNA* (S. Li et al., 2023). En este sentido, el experimento de *screening* masivo planteado en esta Tesis Doctoral, no incorporaba el uso de diferentes medios de cultivo, por lo que podría haber una carencia en ciertos compuestos necesarios para el crecimiento de bacterias del género *Actinophytocola*. Por otro lado, el uso de aislamientos dirigidos mediante secuenciación del genoma, con técnicas de secuenciación *shotgun* que permitan la reconstrucción del genoma a partir de muestras ambientales (MAGs, *metagenome assembled genomes*), es otra herramienta de gran potencial, ya que permite conocer los requerimientos nutricionales específicos de la bacteria y diseñar medios de cultivos específicos para dichas necesidades (Cross et al., 2019; S. Li et al., 2023; Y. Zhou et al., 2022). Por otro lado, es posible que, a pesar de observarse una abundancia relativa alta de *Actinophytocola* por secuenciación masiva, la abundancia absoluta de este taxón sea baja. Esto es una problemática frecuente al analizar datos de secuenciación masiva y está relacionada con la composicionalidad de los datos, la carga microbiana de la muestra y la profundidad de secuenciación (Lin & Peddada, 2020). En futuras investigaciones, una posible aproximación sería el diseño de un experimento de qPCR específico para este género, que permitiese detectar aquellas muestras con una abundancia absoluta alta y concentrar en ellas los esfuerzos de aislamiento.

Durante los intentos de aislamiento de bacterias del género *Actinophytocola*, se obtuvieron aislados de géneros con potenciales funciones de interés para la planta. Dentro del phylum *Actinobacteria*, se obtuvieron 53 aislados del género *Streptomyces*, 7 del género *Kocuria* y 19 del género *Nocardia*. En general, las actinobacterias presentan un gran potencial para promover la salud vegetal por su producción de metabolitos secundarios, como antibióticos, sideróforos u hormonas vegetales (Boukhatem et al., 2022). Particularmente, *Streptomyces* es el género más estudiado dentro de las actinobacterias y la mayoría de aislados estudiados en planta producen efectos beneficiosos en el crecimiento, siendo muy escasas las cepas fitopatogénicas conocidas (Seipke et al., 2012). Así, se ha descrito su capacidad biofertilizante, bioestimulante y bioprotectora. Esto se ha relacionado con funciones como la solubilización de fosfato por acidificación, producción de sideróforos, producción de ácido indolacético y de compuestos antifúngicos (Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016; Viaene et al., 2016). Recientemente, se ha publicado el genoma de *Streptomyces* sp. cepa SA51 (aislado de rizosfera de olivo), cuyo análisis apunta a la presencia de rutas metabólicas implicadas en la promoción del crecimiento vegetal (Shiva et al., 2020). Sin embargo, hasta la fecha de este estudio, no se habían obtenido aislados de *Streptomyces* de la endosfera radicular del olivo, por lo que nuestros resultados sientan un precedente y abren la puerta a futuros trabajos centrados en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para la caracterización funcional de cepas endófitas del género *Streptomyces*. Asimismo, nuestros resultados constituyen el primer registro de aislamiento de bacterias de los géneros *Nocardia* y *Kocuria* de la endorrizosfera del olivo. En este sentido, si bien el género *Nocardia* se encuentra mucho menos caracterizado que *Streptomyces*, se han obtenido aislados de *Nocardia* de rizosfera, endosfera y nódulos de plantas actinorrícicas (Nouioui et al., 2022). Existe evidencia sobre el potencial de aislados de *Nocardia* en la promoción del crecimiento vegetal, tanto a nivel experimental en cuanto a la producción de fitohormonas, como en cuanto a la predicción de clústeres genéticos en su genoma implicados en producción de metabolitos secundarios (Ghodhbane-Gtari et al., 2019). En cuanto al género *Kocuria*, se han descrito cepas con la capacidad de promover el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino (Afridi et al., 2021; Dif et al., 2021; Goswami et al., 2014). Por último, se obtuvieron aislados de *Rhizobium* a partir de nódulos de leguminosas que fueron inoculadas con extracto de raíz de olivo.

Si bien las bacterias del género *Rhizobium* han sido ampliamente estudiadas en cuanto a la fijación simbiótica de nitrógeno en nódulos de leguminosas, también se ha descrito su presencia como endófitos en especies no leguminosas, con potencial actividad promotora del crecimiento vegetal (Antoun et al., 1998; Bartoli et al., 2022; J. J. Zhao et al., 2017). En el caso del olivo, su presencia ha sido descrita en la endosfera radicular en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, así como en los resultados de esta Tesis Doctoral (Fernández-González et al., 2019; Wentzien et al., 2023). Sin embargo, hasta la fecha no se había descrito el aislamiento de ninguna bacteria del género *Rhizobium* proveniente de la endorrizosfera del olivo. En este sentido, este género no sólo presenta características de gran interés como PGPB, sino también como agente de biocontrol. Según el estudio de Cardoni y colaboradores (2023), se encontró un aumento en la abundancia relativa del género *Rhizobium* frente a la inoculación con PIC73, un agente de biocontrol efectivo contra la verticilosis del olivo. Además, otros autores han descrito aislados del género *Rhizobium* con actividad antagonista contra el agente causante de la tuberculosis del olivo (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) (Mina et al., 2020).

En cuanto a la caracterización de los aislados obtenidos, los árboles filogenéticos basados en la secuencia del gen *16S rRNA* apuntan a una baja diversidad para los géneros *Rhizobium*, *Nocardia*, *Kocuria* y *Paenibacillus*, ya que todos los aislados tuvieron una secuencia 100 % idéntica para dicho gen, con la excepción de un aislado del género *Nocardia*. Este no fue el caso del género *Streptomyces*, donde la diferenciación en 8 grupos apuntaría a una mayor diversidad filogenética de los aislados, lo que resulta de interés por las potenciales funciones beneficiosas de bacterias de este género en la promoción del crecimiento vegetal y la defensa frente a patógenos. Aun así, sería necesaria la realización de otros experimentos para una caracterización en profundidad de los aislados. En este sentido, ha sido ampliamente demostrado que la clasificación taxonómica de aislados bacterianos no debe basarse únicamente en la secuencia del gen *16S rRNA*, sino que son necesarios análisis de genes *housekeeping* (tales como *recA*, *atpD* y *glnII*) y de perfiles genéticos *RAPD* (del inglés *randomly amplified polymorphic DNA*) (Gaunt et al., 2001; Lasa, 2019) para poder resolver diferencias taxonómicas entre especies. Además, tanto para géneros del phylum *Actinobacteria* como *Firmicutes*, la

identificación y descripción de nuevas especies se basa tanto en datos genotípicos y filogenéticos como fenotípicos (D. H. Lee et al., 2022; Sáez-Nieto et al., 2017). De esta manera, para el caso del phylum *Actinobacteria*, se ha propuesto el uso de datos de genomas completos para una mejor clasificación taxonómica de cepas pertenecientes al mismo (Nouioui et al., 2018).

En conclusión, la endosfera de las raíces de olivo representa una interesante fuente de bacterias con potenciales actividades promotoras del crecimiento vegetal y como agentes de biocontrol. En este capítulo, se describe por primera vez el aislamiento de diversos géneros altamente representados en la endorrizosfera del olivo, lo que abre la puerta a futuros estudios para la caracterización funcional tanto *in vitro* como *in vivo* de la bacteriota endófito de la raíz. Sin embargo, no se consiguió el aislamiento de uno de los géneros predominantes según secuenciación masiva en este compartimento vegetal, *Actinophytocola*, enfatizando la necesidad de utilizar técnicas de culturómica que permitan obtener una mayor representación de la diversidad de bacterias cultivables provenientes de la raíz del olivo.



# **DISCUSIÓN GENERAL**



## **DISCUSIÓN GENERAL**

El cultivo del olivo y la producción del aceite de oliva han supuesto una pieza clave tanto para la cultura como para la economía de las poblaciones mediterráneas durante milenios (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). A día de hoy, el olivo supone una fuente económica de gran importancia para numerosos países, entre los cuales España se coloca como el primer productor y exportador de aceite de oliva del mundo (<https://www.fao.org/faostat/es>). Con el creciente interés económico del aceite de oliva y la tendencia a una agricultura más industrializada, en las últimas décadas se ha observado un cambio en el manejo agrícola del olivar hacia modelos intensivos o súper intensivos (con densidades de 200 a 2.5000 árboles/ha), con un aumento en el uso de productos fitosanitarios y una mayor mecanización de la recolección (Guerrero-Casado et al., 2021; Morgado, 2022; Romero-Gámez et al., 2017; Servicio de Estudios y Estadísticas, 2019). Este tipo de prácticas agrícolas genera impactos negativos en el agroecosistema, afectando a la biodiversidad del mismo y contribuyendo a la degradación del suelo (Ferreira et al., 2022; Guerrero-Casado et al., 2021; Morgado et al., 2020; Vasconcelos et al., 2022; T. Wu et al., 2008). Además, tienen un impacto negativo tanto a nivel medioambiental como en la salud humana derivado del uso de fertilizantes y pesticidas de síntesis (Gu et al., 2021; Inserm, 2021; Jayaraj et al., 2017). A su vez, esto lleva a ecosistemas menos resilientes en la respuesta a diferentes estreses, como pueden ser los fenómenos asociados al cambio climático, sobre todo en zonas especialmente sensibles como es la Cuenca Mediterránea, así como diferentes estreses bióticos, tales como la verticilosis del olivo entre otras enfermedades, cuya propagación se facilita en sistemas con regadío (Baroudy et al., 2018; Benitez-Alfonso et al., 2023). En este sentido, existe un creciente interés en abogar por prácticas agrícolas más sostenibles, que mantengan y promuevan la salud de la planta y del ecosistema donde se incluye (Sietz et al., 2022). Así, una alternativa cada vez más estudiada es la inoculación de microorganismos beneficiosos, junto con el uso de prácticas agrícolas que favorezcan la preservación de las comunidades microbianas del suelo y las asociadas a la planta. Se sabe que las interacciones planta-microorganismo juegan un papel crucial en la salud vegetal, incluidas las que ocurren en la rizosfera y la endosfera de las raíces

(Berg et al., 2014, 2017; Compant et al., 2010), con funciones como la promoción del crecimiento vegetal, protección contra patógenos y mejora en la absorción de nutrientes (Berg et al., 2014; Compant et al., 2010; Mercado-Blanco et al., 2018; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Si bien estos aspectos han sido ampliamente estudiados en herbáceas, las leñosas, y particularmente el olivar, han recibido considerablemente menos atención. Por ello, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se abordó el objetivo de estudiar el microbioma de la raíz de olivo en relación al manejo agrícola aplicado, así como en relación a los niveles de tolerancia a la verticilosis de diferentes genotipos de olivo en condiciones de campo. Asimismo, se planteó el estudio de reservorios de microorganismos menos explorados, tales como la endosfera radicular y la semilla del olivo. En este sentido, se realizaron aislamientos de bacterias a partir de raíces de olivo y se describió, por primera vez, la microbiota de la semilla. Estos serán, por tanto, los ejes estructuradores de esta discusión general.

En primer lugar, es necesario mencionar que muchos de los avances llevados a cabo en el estudio del microbioma de plantas en general, y del olivo en particular, van de la mano de los avances en técnicas de secuenciación masiva. Estas técnicas permiten la identificación simultánea de numerosas especies microbianas en muestras de ADN ambiental, logrando una expansión en los estudios de ecología microbiana (Creer et al., 2016; Hakimzadeh et al., 2023). Así, estas técnicas generan un alto volumen de datos que deben ser analizados con herramientas bioinformáticas especializadas. Esto acarrea una serie de problemáticas, como la necesidad de formación especializada en áreas de informática y en la gran variedad de herramientas disponibles, que dificulta la elección por parte del usuario y, por tanto, merma la reproducibilidad de los análisis (Hakimzadeh et al., 2023). En este sentido, y en el marco de esta Tesis Doctoral, se desarrolló un flujo de trabajo (comúnmente denominado con los anglicismos “workflow” o “pipeline”) a modo de tutorial ([https://nuriamw.github.io/micro4all/tutorial/package\\_workflow.html](https://nuriamw.github.io/micro4all/tutorial/package_workflow.html)), con una librería de funciones de R asociada, enfocado en el análisis de comunidades microbianas secuenciadas mediante *metabarcoding*. El objetivo fue conseguir una herramienta que aunara el uso de un lenguaje de programación, lo que permite un mayor grado de personalización del análisis y la facilidad de implementación por el usuario. Gracias a

estos esfuerzos, este flujo de trabajo facilitó el análisis de los resultados obtenidos tanto en el Capítulo III como en el capítulo IV de esta Tesis Doctoral, así como en posteriores trabajos de nuestro grupo de investigación y de otros grupos internacionales (Cardoni et al., 2023; Fernández-González, Lasa, et al., 2023; Fernández-González, Villadas, et al., 2023; Maestro-Gaitán et al., 2023; Perdomo-González et al., 2023; Reigel & Hellberg, 2023).

Dicho esto, procederemos a la discusión de los puntos mencionados anteriormente, comenzando por el efecto del manejo agrícola en las comunidades microbianas del olivar. Por una parte, se estudiaron dos fincas adyacentes de olivo, una bajo un manejo convencional (CM), con arado del suelo y aplicación de productos fitosanitarios, y otra bajo un manejo orgánico (OM), que incluía aplicación de estiércol de oveja y ausencia de arado. Por otro lado, se estudió una finca de olivos con manejo convencional (OL), así como un bosque de encina autóctono adyacente a dicha finca (HO). En ambos estudios se evaluaron las propiedades fisicoquímicas del suelo, observándose niveles significativamente mayores de materia orgánica tanto en HO como en OM. Además, el estiércol de oveja también influyó en otros niveles nutricionales, observándose un aumento significativo de nitratos, nitrógeno total y fósforo. Estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores en cuanto al efecto de enmiendas orgánicas en las propiedades fisicoquímicas del suelo, mejorando no solo los niveles de materia orgánica del suelo, sino otras características como la porosidad, agregación y capacidad de retención de agua (Celik et al., 2004; Chernov & Semenov, 2021; French et al., 2021; S. T. Lucas et al., 2014; Tejada et al., 2008). Además, nuestros resultados no solo apuntan al efecto de las enmiendas orgánicas, sino también a la presencia/ausencia de manejo agrícola, ya que el suelo HO fue más rico en materia orgánica respecto a OL, lo que puede ser debido a la ausencia de arado y retirada de la materia vegetal del suelo. Estos resultados evidencian la influencia del manejo agrícola en las propiedades del suelo, que se encuentra en interconexión con las comunidades microbianas del mismo y con aquellas asociadas a la planta (Berg et al., 2014; Bevivino et al., 2014; Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Y. Liang et al., 2015; Lo, 2010, 2010).

En este sentido, en el estudio comparativo entre olivar y encinar, se observó la presencia de un efecto rizosférico en la comunidad bacteriana de las encinas, es decir,

una mayor diversidad bacteriana en la rizosfera de la encina respecto al suelo suelto. Esto se puede relacionar con la secreción de exudados radiculares que promueven el crecimiento y actividad microbiana (Berg & Smalla, 2009; Vives-Peris et al., 2019). Este efecto, sin embargo, estuvo ausente en el olivar adyacente, apuntando a un posible efecto de homogeneización asociado a las prácticas agrícolas implementadas.

En cuanto a la comunidad fúngica, se observó el comportamiento contrario a la comunidad bacteriana, con una menor diversidad en el suelo suelto de encinar respecto al olivar. Si bien estas observaciones podrían verse afectadas por la comparación entre dos especies vegetales diferentes, los resultados del Capítulo III de esta Tesis Doctoral, donde se evalúan fincas de olivo adyacentes, confirmaron la influencia del manejo agrícola en las comunidades microbianas de la rizosfera y de la endosfera radicular. En dicho estudio (comparando manejo convencional frente orgánico), se observó un aumento de la diversidad  $\alpha$  de la comunidad fúngica tanto en la rizosfera como en la endosfera de olivos cultivados bajo un manejo orgánico. Esta mayor diversidad fúngica en OM entra en discrepancia con lo observado en la comparación olivar-encinar. Sin embargo, un estudio reciente de Labouyrie y colaboradores (2023), donde se analizaron las comunidades fúngicas y bacterianas a lo largo de 24 países europeos en función de la perturbación del suelo por el manejo empleado, encontró una mayor diversidad fúngica en suelos agrícolas respecto a bosques. Esto se atribuye a una mayor disponibilidad de nicho en los suelos agrícolas, debido a la perturbación del suelo por las prácticas implementadas, tales como el laboreo. Estos resultados podrían explicar lo observado en la comparación olivar-encinar y la discrepancia al comparar olivares con diferentes manejos agrícolas (Labouyrie et al., 2023).

Además de las diferencias encontradas en la diversidad  $\alpha$ , la estructuración de la comunidad bacteriana y fúngica difirió entre los manejos agrícolas estudiados, tanto en la comparación olivar-encinar como OM-CM, según lo mostrado por el análisis de diversidad  $\beta$ . Así, nuestros resultados concuerdan con lo descrito por otros autores, en cuanto al efecto del manejo agrícola en la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a plantas (Laconi et al., 2021; H. Li et al., 2021; Qiao et al., 2019; Windisch et al., 2021; X. Wu et al., 2022). Sin embargo, dadas las discrepancias encontradas en los resultados, y según discuten Labouyrie y colaboradores, la diversidad microbiana puede

no ser indicativa por sí sola del estado de las comunidades microbianas del agroecosistema y de su relación con los servicios ecosistémicos proporcionados. Por tanto, se llevaron a cabo análisis complementarios, como es el caso de la determinación de la biomasa microbiana, así como de la composición taxonómica y predicción de rutas metabólicas.

En cuanto a la biomasa microbiana, nuestros resultados apuntan a una mayor biomasa fúngica en la rizosfera de olivos cultivados bajo un manejo orgánico. Esto concuerda con lo descrito por otros autores para diversas especies vegetales bajo enmiendas orgánicas (Das et al., 2017; J. Li et al., 2015; Luan et al., 2020; Qi et al., 2016; Q. C. Zhang et al., 2012). Esta mayor biomasa fúngica en la rizosfera podría suponer un aumento en la presencia de hongos con funciones beneficiosas para la planta, incrementando la disponibilidad y absorción de nutrientes y la defensa frente a patógenos, entre otros (Mendes et al., 2013). Así, el estudio de la biomasa microbiana de la rizosfera se plantea como una herramienta de utilidad para evaluar el efecto del manejo agrícola en los microorganismos asociados a la planta, si bien sería interesante complementar estos análisis con estudios de actividad microbiana.

Por otro lado, en cuanto a la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas asociadas al suelo y raíz del olivar, nuestros resultados apuntan a una influencia clara del manejo agrícola. En este sentido, en la finca con manejo convencional (CM), se observó un aumento en taxones microbianos descritos en ambientes con menor cantidad de materia orgánica, así como con un menor contenido en agua, tales como los phyla *Acidobacteria* y *Gemmatimonadetes* (DeBruyn et al., 2011). Esto coincide con lo encontrado al comparar el cultivo de olivo frente al bosque de encinas, donde se encontró un aumento del género *Gemmatimonas* tanto en el suelo suelto como en el suelo rizosférico del olivar, asociado de manera estadísticamente significativa con una menor cantidad de materia orgánica. Además, en ambos estudios, en la rizosfera de CM y de OL, encontramos una mayor abundancia de géneros bacterianos que han sido previamente relacionados con la degradación de herbicidas y pesticidas, como es el caso de *Rubrobacter* y *Sphingomonas*, pero este último tan solo en la finca CM (Holmes et al., 2006; Leys et al., 2004; X. Li et al., 2015; Moffett et al., 2003; Sørensen et al., 2001). Por otro lado, los olivos cultivados bajo un

manejo orgánico poco invasivo (ausencia de arado del suelo), mostraron un aumento en phyla relacionados con la degradación de materia orgánica, tales como *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Francioli et al., 2016; Larsbrink & McKee, 2020; S. Zhang et al., 2020). De hecho, otros autores han confirmado la respuesta del phylum *Bacteroidetes* a las diferentes prácticas agrícolas utilizadas (Wolińska et al., 2017; Y. Yang et al., 2017; S. Zhang et al., 2020). Además, se observó un aumento en funciones metabólicas de interés para la nutrición y salud vegetal, relacionadas con el ciclo del nitrógeno (asociado al género *Nitrospira*), degradación de compuestos aromáticos y defensa frente a patógenos fúngicos y nematodos (quitinolisis). En cuanto a la comunidad fúngica, en la finca sometida a manejo orgánico, se observó un aumento de los grupos funcionales asociados a degradación de materia orgánica, tales como saprófitos de estiércol y saprófitos de hojarasca, tanto en la rizosfera como en la endosfera de los olivos estudiados, así como una mayor abundancia relativa de géneros relacionados con producción de compuestos antimicrobianos y promoción del crecimiento vegetal (*Preussia* y *Cladophialophora*) (Hartmann et al., 2015; Mapperson et al., 2014; Semenov et al., 2022; Thambugala et al., 2020).

En el estudio de las fincas CM y OM, también se analizaron las redes de coocurrencia microbiana, revelando una mayor complejidad en las redes de la rizosfera de OM, así como una menor distancia geodésica media (GD) tanto en rizosfera como en endosfera. La mayor complejidad de la red asociada a la aplicación de estiércol ha sido descrita previamente para trigo y álamo y podría estar relacionada con el nivel nutricional del suelo, que favorece la diversidad de nichos disponibles así como la cooperación entre microorganismos para la degradación de materia orgánica recalcitrante (G. Wang et al., 2022; P. Wang et al., 2022). La menor GD, por su parte, se podría relacionar con redes más resilientes a perturbaciones, ya que se postula su relación con la eficiencia en la interacción entre miembros de la red (Gómez-Lama Cabanás et al., 2022; Qu et al., 2020; Strang et al., 2018; Tao et al., 2018; P. Wang et al., 2022; G. Ye et al., 2021).

En general, los resultados aquí presentados muestran cómo el manejo agrícola afecta a las propiedades fisicoquímicas del suelo, así como a las comunidades microbianas del suelo y del interior de la raíz. Los manejos menos invasivos y los aportes

nutricionales orgánicos, tales como el estiércol, influyen a las comunidades microbianas del olivar de manera positiva a diversos niveles, aumentando la diversidad microbiana, la biomasa fúngica en la rizosfera, así como favoreciendo el enriquecimiento en grupos taxonómicos y funcionales involucrados en la movilización de nutrientes, la lucha frente a patógenos y la promoción del crecimiento vegetal. Nuestros resultados se encuentran en sintonía con estudios llevados a cabo en diferentes especies vegetales, observándose una influencia del manejo agrícola en las comunidades microbianas de suelo y raíz (Bevivino et al., 2014; Gossner et al., 2016; Jacobsen & Hjelmsø, 2014; Labouyrie et al., 2023; Lo, 2010; Romdhane et al., 2022; Yu et al., 2023). Los resultados de esta Tesis Doctoral sientan un precedente en cuanto a los estudios de microbioma del olivo, ya que, según la bibliografía evaluada hasta la fecha, no se encontraban estudios que abordasen el efecto del manejo agrícola en las comunidades fúngicas y bacterianas del suelo y raíces de olivo en condiciones de campo, utilizando técnicas de secuenciación masiva y combinando análisis de cuantificación de biomasa microbiana, redes de coocurrencia y de propiedades fisicoquímicas del suelo (Caliz et al., 2015; Fausto et al., 2018; Llimós et al., 2021; Palla et al., 2020; Sofo et al., 2014).

En cuanto a otro tipo de estreses, como son los bióticos, a los que se enfrenta el olivar, la verticilosis es considerada como una de las afecciones más significativas del olivo debido a la alta pérdida de producción asociada a la enfermedad (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). Una de las prácticas más sostenibles para su manejo es la utilización de genotipos tolerantes/resistentes, tales como Frantoio, en lugar de otros genotipos más susceptibles, como Arbequina o Picual (Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020). Si bien se han realizado estudios sobre el papel de la genética del hospedador en la resistencia al patógeno (Jiménez-Ruiz et al., 2017; Jiménez-Ruiz, Leyva-Pérez, Gómez-Lama Cabanás, et al., 2019; Ramírez-Tejero et al., 2021), hasta la fecha de esta Tesis Doctoral poco se conocía sobre el papel de la microbiota de la raíz. En este sentido, Fernández-González y colaboradores (2020) encontraron un enriquecimiento en géneros bacterianos con funciones beneficiosas para la salud vegetal y lucha contra patógenos en el genotipo Frantoio respecto a Picual. Sin embargo, este estudio se realizó en condiciones controladas, por lo que el diseño experimental planteado en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral supondría el primer análisis de este

tipo en condiciones de campo. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron una ausencia de diferencias en la comunidad bacteriana y fúngica de la rizosfera de los genotipos Picual y Frantoio, crecidos en condiciones de campo bajo un manejo agrícola convencional. Esto contrasta con lo descrito tanto para el olivo como para otras especies vegetales, en cuanto a que el genotipo es un factor clave en la estructuración de las comunidades microbianas (Bulgarelli et al., 2012; Engelbrektsen et al., 2012; Fernández-González et al., 2019). La ausencia de diferencias podría verse relacionada con la presencia de un manejo agrícola invasivo, donde el arado del suelo y el uso de productos fitosanitarios actúen como factores homogeneizadores de las comunidades microbianas. Así, bajo las condiciones de estudio aquí descritas, no encontramos diferencias en la comunidad microbiana de la rizosfera en genotipos de olivo con resistencias diferenciales a la verticilosis. Futuros estudios serían necesarios para confirmar si estas diferencias podrían ser observadas en la endosfera de la raíz, compartimento que podría encontrarse más directamente influenciado por el genotipo del hospedador (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014).

Otro de los objetivos de esta Tesis, y en relación a la búsqueda de prácticas más sostenibles para el manejo agrícola del olivar y su respuesta a estreses a/bióticos, se centró en el estudio de diferentes compartimentos vegetales del olivar como reservorios poco explorados de microorganismos potencialmente beneficiosos para la salud de este cultivo (Bai et al., 2022; Compant et al., 2019; Trivedi et al., 2020). En este sentido, la mayoría de estudios orientados a la búsqueda de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPBs) se centran en aislamientos de suelo y rizosfera. Sin embargo, la endosfera radicular ha sido menos estudiada para diversas especies vegetales, así como para el olivar, si bien existe un creciente interés en este compartimento debido a la descripción de aislados con efectos beneficiosos para la salud vegetal (Bai et al., 2022; Compant et al., 2019; Mercado-Blanco et al., 2004; Prieto et al., 2009; Trivedi et al., 2020). En primera instancia, los aislamientos tuvieron como objetivo la búsqueda del género *Actinophytocola*. Los resultados del capítulo III de esta Tesis Doctoral mostraron que este género fue el más abundante en la endosfera radicular de olivos del genotipo Picual en condiciones de campo, independientemente del manejo agrícola aplicado. Estos resultados se encuentran apoyados por trabajos previos de nuestro grupo de

investigación, donde *Actinopytocola* fue el género mayoritario en la endosfera radicular de múltiples genotipos de olivo (Fernández-González et al., 2019). El interés en su aislamiento no radica tan solo en su alta abundancia relativa, si no en su potencial papel beneficioso para la salud vegetal, ya que se han descrito aislados de *Actinophytocola* con actividades antimicrobianas (Bouznada et al., 2016). Además, un estudio previo de nuestro grupo de investigación demostró que existe una correlación entre la abundancia de *Actinophytocola* y los niveles de expresión de genes relacionados con la defensa frente a fitopatógenos y respuesta a estrés (Fernández-González et al., 2021). Sin embargo, a pesar de las múltiples técnicas de aislamiento empleadas específicas para la obtención de géneros de actinobacterias, no fue posible obtener ningún aislado de este género. Esto puede deberse a múltiples factores que dificultan el cultivo en laboratorio de estas y otras bacterias, como puede ser el requerimiento de factores de crecimiento específicos en el medio, la presencia de relaciones sintróficas con otros microorganismos, el lento crecimiento, así como la presencia de bacterias en estados de dormancia (Cross et al., 2019; Lewis et al., 2020; Podolich et al., 2015). Por ello, el uso de técnicas de culturómica y aislamientos dirigidos mediante secuenciación del genoma podrían ser estrategias útiles en futuras investigaciones. Otro planteamiento de interés sería el diseño de un experimento de qPCR específico para *Actinophytocola*, con objeto de concentrar esfuerzos de aislamiento en muestras con alta abundancia absoluta de este género.

A pesar del aislamiento fallido de *Actinophytocola*, la endosfera radicular del olivo se presentó como un compartimento rico en géneros bacterianos cultivables con potenciales funciones beneficiosas para la planta. En este sentido, se obtuvieron aislados pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Nocardia*, *Kocuria*, *Paenibacillus* y *Rhizobium*. En concreto, la gran mayoría de los aislados de planta pertenecientes al género *Streptomyces* se relacionan con un aumento del crecimiento vegetal, con capacidad biofertilizante, bioestimulante y bioprotectora (Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016; Viaene et al., 2016). En cuanto a *Nocardia*, se encuentran evidencias experimentales, así como de predicción de clústeres genéticos, en relación a la producción de metabolitos secundarios implicados en la salud vegetal, tales como fitohormonas (Ghodhbane-Gtari et al., 2019). Por su parte, aislados del género *Kocuria*

se han descrito como promotores del crecimiento vegetal bajo estrés salino (Afridi et al., 2021; Dif et al., 2021; Goswami et al., 2014). En cuanto al género *Rhizobium*, su presencia como endófito en especies no leguminosas se ha relacionado con actividad PGPB (Antoun et al., 1998; Bartoli et al., 2022; J. J. Zhao et al., 2017). Además, para el caso específico del olivar, ha mostrado potenciales actividades de biocontrol, debido al aumento de su abundancia relativa frente a la inoculación de PIC73, agente de biocontrol contra la verticilosis del olivo (Cardoni et al., 2023), así como la actividad antagonista de aislados de este género frente a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Mina et al., 2020). De igual forma, Markakis y colaboradores (2016) han descrito aislados del género *Paenibacillus* con capacidad de biocontrol contra la verticilosis del olivo. Así, los resultados de esta Tesis Doctoral constituyen la primera descripción del aislamiento de bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Nocardia*, *Kocuria* y *Rhizobium* de la endosfera radicular de olivos, sentando un precedente en la búsqueda de PGPBs que puedan ser utilizados como bioinóculos en un manejo más sostenible del olivar. Sin embargo, queda pendiente en futuras líneas de investigación la posibilidad de completar la caracterización taxonómica y funcional de estos aislados, ya que en esta Tesis Doctoral se abordó solo a nivel de la secuencia completa del gen ribosomal *16S rRNA*.

En cuanto a la búsqueda de otros potenciales reservorios de PGPMs, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo, por primera vez, el estudio del microbioma de la semilla de olivo. Diversos autores han constatado la influencia de los microorganismos de la semilla en la salud vegetal, con efectos tales como la alteración del período de dormancia y germinación de la semilla, el aumento del crecimiento de plántulas, la protección frente a patógenos (como *Burkholderia plantarii*), así como la protección frente a sequía (Goggin et al., 2015; Hone et al., 2021; Matsumoto et al., 2021; Walitang et al., 2017). En este sentido, la microbiota de las semillas de distintas especies vegetales atrae cada vez más interés, si bien las especies leñosas en general han recibido considerablemente menos atención, siendo un área completamente inexplorada para el caso del olivo (Simonin et al., 2022). Así, se propuso la descripción de la microbiota de la semilla de olivo como paso previo al aislamiento, lo que permite conocer si existe o no una microbiota diversa en este compartimento vegetal, además de proporcionar información sobre las diferencias entre genotipos, lo que puede ayudar a restringir los

aislamientos a genotipos enriquecidos en microorganismos potencialmente beneficiosos. En dicho estudio, las semillas de olivo presentaron una microbiota diversa, con características diferenciadoras respecto a lo observado en otras especies vegetales. La principal característica diferenciadora fue que el perfil taxonómico bacteriano se vio dominado por el phylum *Actinobacteria* en contraposición a *Proteobacteria*, el phylum dominante en semillas de otras especies vegetales (Simonin et al., 2022). Dentro de este phylum, el género más abundante fue *Streptomyces*. Estos resultados remarcan la importancia de las actinobacterias en el olivar, concordando con los resultados descritos en esta Tesis Doctoral y en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en los que se describió el phylum *Actinobacteria* como el más abundante en la endosfera de raíces de olivos pertenecientes a diferentes genotipos (Fernández-González et al., 2019). Además, y tal y como se discutió anteriormente en cuanto a los aislados obtenidos de endosfera de olivo, el género *Streptomyces* destaca por sus potenciales funciones para promover el crecimiento vegetal (Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016; Viaene et al., 2016). En esta línea, se ha descrito la capacidad de algunos aislados de *Streptomyces* para producir auxinas, hormonas vegetales que participan en la regulación de la germinación de semillas y desarrollo del fruto (Figueiredo & Köhler, 2018; Guo et al., 2022; Mei et al., 2023; Miransari & Smith, 2014; Seipke et al., 2012; Sousa & Olivares, 2016; M. Wu, Wu, et al., 2020). Por tanto, sería de gran interés tanto obtener aislados de *Streptomyces* de semilla, como explorar la capacidad de los aislados ya obtenidos de endosfera de raíz de olivo en regular la germinación de semillas y crecimiento de la aceituna, lo que aumentaría los conocimientos sobre el papel de *Streptomyces* en la salud del olivo en diferentes etapas de su desarrollo, con potenciales aplicaciones en la producción agrícola de aceituna y el rendimiento de la extracción de su aceite. Además de *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora* fueron géneros de actinobacterias relevantes también en la microbiota de semilla, ya que se detectaron tanto en semillas como en la endosfera radicular de los mismos árboles (muestreados también en la WOGC), apuntando a una posible vía de transmisión acropetal de microorganismos por vía vascular a lo largo del eje raíz-flor. Para ambos géneros se han descrito actividades promotoras del crecimiento vegetal, así como producción de antibióticos (Alotaibi et al., 2022; Nouioui et al., 2022; Trujillo et al., 2015). En esta Tesis Doctoral, también se describe la obtención de aislados del género *Nocardia* de la

endosfera de raíz, lo que apunta a que su aislamiento a partir de tejidos de olivo es plausible y que podría ser un candidato de interés para futuros aislamientos a partir de semilla. En cuanto a otros géneros compartidos entre semilla y endorrizosfera, destaca *Sphingomonas* por verse asociado con las semillas y raíces de genotipos resistentes a la verticilosis del olivo (Frantoio y Uslu). Además, este género es conocido por su capacidad para degradar contaminantes y luchar contra patógenos (Matsumoto et al., 2021; Sørensen et al., 2001). De hecho, en el capítulo III de esta Tesis, se describe cómo el género *Sphingomonas* tuvo una abundancia relativa mayor en la finca CM, es decir, en una finca sometida a aplicación de fitosanitarios.

En cuanto a la comunidad fúngica de la semilla, destaca *Cladosporium* como el género relativamente más abundante y prevalente en los genotipos analizados. Este resultado está de acuerdo con lo descrito para semillas de otras especies vegetales (Simonin et al., 2022). Algunos aislados de este género han mostrado actividades involucradas en la promoción del crecimiento vegetal y defensa contra patógenos (Hamayun et al., 2009; Răut et al., 2021). De hecho, se ha visto su asociación con ramas asintomáticas a la tuberculosis del olivo (producida por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*), así como la producción de compuestos antimicrobianos contra especies de *Colletotrichum* (agente causal de la antracnosis del olivo) (Moral & Trapero, 2009; Preto et al., 2017; X. Wang et al., 2013).

Así, las semillas de olivo se presentan como una interesante fuente de microorganismos beneficiosos para el olivo. Por tanto, es de relevante importancia que en futuros estudios se lleve a cabo la obtención de aislados de semilla y su caracterización taxonómica y funcional. Sería de especial interés conocer el efecto de dichos aislados en el proceso germinación, así como en el crecimiento de las plántulas y salida del período juvenil. Este conocimiento podría aplicarse en trabajos de mejora genética, donde se desarrollan nuevos genotipos de olivo con características agronómicas de interés, proceso en el cual la salida del período juvenil es el principal factor limitante a nivel temporal.

# **CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONS

1. The Micro4all workflow has improved, simplified and made more reliable the process of analysing large microbial ecology datasets through the integration of various tools in R, enabling users to customize analysis parameters according to their specific requirement.
2. Our results show that conventional olive orchard management suppresses the rhizosphere effect described in wild plants, with no differences in the microbial communities of bulk soil and olive rhizosphere.
3. The absence of conventional agronomic practices in olive orchards and the application of sheep manure improves soil's nutrient content, the main effect of which is the increase in organic matter.
4. Organic management with the application of sheep manure in the olive orchard changed the alpha and beta diversity, both in the rhizosphere and the root endosphere, increasing the alpha diversity of fungi in both compartments and their biomass in the rhizosphere.
5. Conventional management of olive orchards increase the abundance of bacteria associated with the degradation of herbicides and pesticides, such as genera *Rubrobacter* and *Sphingomonas*. On the other hand, organic management enhances the potential microbial functions involved in plant health and nutrition, as well as some fungal groups associated with organic matter decomposition.
6. The co-occurrence networks show, as indicated by the shorter geodesic distance and higher network complexity, a more resilient microbial community to disturbances and stresses in both the rhizosphere and root endosphere of the organic olive orchard.
7. Under the conditions studied here, no correlation was found between the microbiota of olive roots and their tolerance/susceptibility to *Verticillium* wilt of olive.

## CONCLUSIONS

---

8. The endosphere of olive roots is rich in genera described as plant growth-promoting bacteria, from which strains belonging to the genera *Streptomyces*, *Nocardia*, *Kocuria*, *Paenibacillus* and *Rhizobium* have been isolated
9. Seeds of different olive genotypes harbour a diverse microbiota with distinctive characteristics, such as the high relative abundance of the phylum *Actinobacteria* with genotype being a determining factor in the structure of the olive seed microbial community.
10. The seed microbiome represents a source of putative plant growth-promoting microorganisms such as *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Sphingomonas* and *Cladosporium*.
11. The presence of shared bacterial and fungal genera between seeds and the root endosphere of the same trees suggests an acropetal movement and a possible route of vertical transmission of microorganisms.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abdelfattah, A., Li Destri Nicosia, M. G., Cacciola, S. O., Droby, S., & Schena, L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLOS ONE*, *10*(7), e0131069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131069>
- Abdelfattah, A., Ruano-Rosa, D., Cacciola, S. O., Li Destri Nicosia, M. G., & Schena, L. (2018). Impact of *Bactrocera oleae* on the fungal microbiota of ripe olive drupes. *PLoS ONE*, *13*(11), e0199403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199403>
- Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2022). From seed to seed: The role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*, *31*(4), 346-355. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>
- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Schena, L., & Tack, A. J. M. (2021). Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental Microbiology*, *23*(4), 2199-2214. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15392>
- Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y., & Allen, V. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(11), 2762-2770. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.022>
- Adetunji, A. T., Ncube, B., Mulidzi, R., & Lewu, F. B. (2020). Management impact and benefit of cover crops on soil quality: A review. *Soil and Tillage Research*, *204*, 104717. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2020.104717>

Aforo de producción de olivar en Andalucía (2023).

Afridi, M. S., Van Hamme, J. d., Bundschuh, J., Sumaira, Khan, M. N., Salam, A., Waqar, M., Munis, M. F. H., & Chaudhary, H. J. (2021). Biotechnological approaches in agriculture and environmental management—Bacterium *Kocuria rhizophila* 14ASP as heavy metal and salt- tolerant plant growth- promoting strain. *Biologia*, 76(10), 3091-3105. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00826-6>

Ahmad Yassin Majjami, Abdullah Saad Al-Modaihsh, Fahad Nasser Al-Barakah, Mohamed Hamza El-Saeid, Samir Gamil Al-Solimani, & Fahad Mohammed Alghabari. (2020). Comparing microbial community heterogeneity in soil under organic and conventional agricultural system cultivated with olive and peach trees in three fields differ with age at Al-Jouf Saudi Arabia. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 7(3), 283-290. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2020.7.3.0350>

Aitchison, J. (1982). The statistical analysis of compositional data. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 44(2), 139-160. <https://doi.org/10.1111/J.2517-6161.1982.TB01195.X>

Ait-Ouakrim, E. H., Chakhchar, A., El Modafar, C., Douira, A., Amir, S., Ibensouda-Koraichi, S., Belkadi, B., & Filali-Maltouf, A. (2023). Assessment of potent phosphate-solubilizing bacteria isolated from the olive tree rhizosphere grown on phosphate sludge and their effect on common bean growth. *Geomicrobiology Journal*, 40(6), 605-617. <https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2218839>

Al-Ahmad, M. A., & Mosli, M. N. (1993). Verticillium wilt of olive in Syria. *EPPO Bulletin*, 23(3), 521-529. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2338.1993.TB01364.X>

- Albert Bernhard, F. (1889). *Über die Pilzsymbiose der Leguminosen*. 7(8), 332-346.  
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1889.tb05711.x>
- Alotaibi, F., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2022). In-depth characterization of plant growth promotion potentials of selected alkanes-degrading Plant Growth-Promoting Bacterial isolates. *Frontiers in Microbiology*, 13, 863702.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.863702>
- Amend, A. (2014). From dandruff to deep-sea vents: *Malassezia*-like fungi are ecologically hyper-diverse. *PLOS Pathogens*, 10(8), e1004277.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004277>
- Amvrazi, E. G., & Albanis, T. A. (2009). Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry*, 113(1), 253-261.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.06.073>
- Andermann, T., Antonelli, A., Barrett, R. L., & Silvestro, D. (2022). Estimating alpha, beta, and gamma diversity through deep learning. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1089.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.839407>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32-46. <https://doi.org/10.1111/J.1442-9993.2001.01070.PP.X>
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., & McArdle, B. H. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology letters*, 9(6), 683-693.  
<https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2006.00926.X>
- Anguita-Maeso, M., Haro, C., Montes-Borrego, M., De La Fuente, L., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2021). Metabolomic, ionic and microbial characterization of

- olive xylem sap reveals differences according to plant age and genotype. *Agronomy*, 11(6), 1179. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061179>
- Anguita-Maeso, M., Haro, C., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2022). Primer choice and xylem-microbiome-extraction method are important determinants in assessing xylem bacterial community in olive trees. *Plants*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11101320>
- Anguita-Maeso, M., Olivares-García, C., Haro, C., Imperial, J., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2020). Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota: Effect of sap extraction methods. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1708. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01708>
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalande, R. (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Molecular Microbial Ecology of the Soil*, 57-67. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2321-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2321-3_5)
- Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., & Landa, B. B. (2011). Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *Europaea* var. *Sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant and Soil*, 343(1-2), 329-345. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0721-2>
- Arias-Calderón, R., Rodríguez-Jurado, D., León, L., Bejarano-Alcázar, J., De la Rosa, R., & Belaj, A. (2015). Pre-breeding for resistance to verticillium wilt in olive: Fishing in the wild relative gene pool. *Crop Protection*, 75, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.05.006>

- Atmaca, S., Demiral, S., & Ülger, S. (2021). Effects of chicken manure application on olive (*Olea europaea*) growth. *Agrotechniques in Industrial Crops*, 1(2), 61-70. <https://doi.org/10.22126/atic.2021.6514.1013>
- Bai, B., Liu, W., Qiu, X., Zhang, J., Zhang, J., & Bai, Y. (2022). The root microbiome: Community assembly and its contributions to plant fitness. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 230-243. <https://doi.org/10.1111/JIPB.13226>
- Bakker, P. A. H. M., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C. A., & Pieterse, C. M. J. (2013). The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4, 165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>
- Balzergue, C., Chabaud, M., Barker, D. G., Bécard, G., & Rochange, S. F. (2013). High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers in Plant Science*, 4, 426. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00426>
- Banerjee, S., & van der Heijden, M. G. A. (2022). Soil microbiomes and one health. *Nature Reviews Microbiology*, 21(1), 6-20. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00779-w>
- Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A. Y., Gattinger, A., Keller, T., Charles, R., & van der Heijden, M. G. A. (2019). Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME Journal*, 13(7), 1722-1736. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0383-2>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>

- Baroudy, F., Habib, W., Tanos, G., Gerges, E., Saab, C., Choueiri, E., & Nigro, F. (2018). Long-distance spread of *Verticillium dahliae* through rivers and irrigation systems. *Plant disease*, *102*(8), 1559-1565. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1189-RE>
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., & Rallo, L. (2017). *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa Libros.
- Bartelme, R. P., Custer, J. M., Dupont, C. L., Espinoza, J. L., Torralba, M., Khalili, B., & Carini, P. (2020). Influence of substrate concentration on the culturability of heterotrophic soil microbes isolated by high-throughput dilution-to-extinction cultivation. *mSphere*, *5*(1). <https://doi.org/10.1128/msphere.00024-20>
- Bartoli, C., Boivin, S., Marchetti, M., Gris, C., Gascioli, V., Gaston, M., Auriac, M. C., Debellé, F., Cottret, L., Carlier, A., Masson-Boivin, C., Lepetit, M., & Lefebvre, B. (2022). *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* strains are natural wheat endophytes that can stimulate root development. *Environmental Microbiology*, *24*(11), 5509-5523. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16148>
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, *16*(4), 729-770. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Bastida, F., Torres, I. F., Andrés-Abellán, M., Baldrian, P., López-Mondéjar, R., Větrovský, T., Richnow, H. H., Starke, R., Ondoño, S., García, C., López-Serrano, F. R., & Jehmlich, N. (2017). Differential sensitivity of total and active soil microbial communities to drought and forest management. *Global Change Biology*, *23*(10), 4185-4203. <https://doi.org/10.1111/gcb.13790>

- Beketov, M. A., Kefford, B. J., Schäfer, R. B., & Liess, M. (2013). Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(27), 11039-11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>
- Belaj, A., Dominguez-García, M. del C., Atienza, S. G., Martín Urdíroz, N., de la Rosa, R., Satovic, Z., Martín, A., Kilian, A., Trujillo, I., Valpuesta, V., & Del Río, C. (2012). Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetics and Genomes*, *8*(2), 365-378. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0447-6>
- Benitez-Alfonso, Y., Soanes, B. K., Zimba, S., Sinanaj, B., German, L., Sharma, V., Bohra, A., Kolesnikova, A., Dunn, J. A., Martin, A. C., Khashi Rahman, M., Saati-Santamaría, Z., García-Fraile, P., Ferreira, E. A., Frazã, L. A., Cowling, W. A., Siddique, K. H., Pandey, M. K., Farooq, M., ... Foyer, C. H. (2023). Enhancing climate change resilience in agricultural crops. *Current Biology*, *33*, R1246-R1261. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.10.028>
- Benlloch-González, M., Sánchez-Lucas, R., Bejaoui, M. A., Benlloch, M., & Fernández-Escobar, R. (2019). Global warming effects on yield and fruit maturation of olive trees growing under field conditions. *Scientia Horticulturae*, *249*, 162-167. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.01.046>
- Benlloch-González, M., Sánchez-Lucas, R., Benlloch, M., & Ricardo, F. E. (2018). An approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. *Scientia Horticulturae*, *240*, 405-410. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2018.06.054>

- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), 50. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>
- Berg, G., & Raaijmakers, J. M. (2018). Saving seed microbiomes. *ISME Journal*, 12(5), 1167-1170. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0028-2>
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bergna, A., Cernava, T., Rändler, M., Grosch, R., Zachow, C., & Berg, G. (2018). Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes. *Phytobiomes Journal*, 2(4), 183-193. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-06-18-0029-R>
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84(1), 188-198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188/>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293-300. <https://doi.org/10.1128/JB.62.3.293-300.1951>
- Bevivino, A., Paganin, P., Bacci, G., Florio, A., Pellicer, M. S., Papaleo, M. C., Mengoni, A., Ledda, L., Fani, R., Benedetti, A., & Dalmastri, C. (2014). Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*, 9(8), e105515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105515>

- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, *10*(1), 57-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Bossio, D. A., Girvan, M. S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K. M., Ball, A. S., Pretty, J. N., & Osborn, A. M. (2005). Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of western Kenya. *Microbial Ecology*, *49*(1), 50-62. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0209-6>
- Boukhatem, Z. F., Merabet, C., & Tsaki, H. (2022). Plant Growth Promoting Actinobacteria, the Most Promising Candidates as Bioinoculants? *Frontiers in Agronomy*, *4*, 849911. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.849911>
- Bouznada, K., Bouras, N., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N., & Klenk, H. P. (2016). Actinophytocola algeriensis sp. Nov., an actinobacterium isolated from saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(7), 2760-2765. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001136>
- Boz, B., Mizanur Rahman, M., Bottegal, M., Basaglia, M., Squartini, A., Gumiero, B., & Casella, S. (2013). Vegetation, soil and hydrology management influence denitrification activity and the composition of nirK-type denitrifier communities in a newly afforested riparian buffer. *New Biotechnology*, *30*(6), 675-684. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.009>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, *27*(4), 325-349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

- Bressan, M., Roncato, M. A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F. E. Z., Achouak, W., & Berge, O. (2009). Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *The ISME Journal*, 3(11), 1243-1257. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68>
- Breton, C. M., & Bervillé, A. (2012). New hypothesis elucidates self-incompatibility in the olive tree regarding S-alleles dominance relationships as in the sporophytic model. *Comptes Rendus Biologies*, 335(9), 563-572. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2012.07.006>
- Brito, C., Dinis, L. T., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. M. (2019). Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. *Plants*, 8(7), 232. <https://doi.org/10.3390/PLANTS8070232>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., & Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Caliz, J., Montes-Borrego, M., Triadó-Margarit, X., Metsis, M., Landa, B. B., & Casamayor, E. O. (2015). Influence of edaphic, climatic, and agronomic factors on the composition and abundance of nitrifying microorganisms in the rhizosphere of commercial olive crops. *PLoS ONE*, 10(5), e0125787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125787>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (2004). Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Applied Soil Ecology*, *26*(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.10.009>
- Cardoni, M. (2023). *Omic approaches to manage Verticillium wilt of olive: The olive root microbiome and host and pathogen gene expression patterns in relation with disease susceptibility* [Universidad de Córdoba, UCOPress]. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/25834>
- Cardoni, M., Fernández-González, A. J., Valverde-Corredor, A., Fernández-López, M., & Mercado-Blanco, J. (2023). Co-occurrence network analysis unveils the actual differential impact on the olive root microbiota by two *Verticillium* wilt biocontrol rhizobacteria. *Environmental Microbiome*, *18*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S40793-023-00480-2>
- Cardoni, M., & Mercado-Blanco, J. (2023). Confronting stresses affecting olive cultivation from the holobiont perspective. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1261754. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1261754>
- Carraro, E., & Di Iorio, A. (2022). Eligible strategies of drought response to improve drought resistance in woody crops: A mini-review. *Plant Biotechnology Reports*, *16*(3), 265-282. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00733-x>
- Carro, L., Razmilic, V., Nouioui, I., Richardson, L., Pan, C., Golinska, P., Asenjo, J. A., Bull, A. T., Klenk, H. P., & Goodfellow, M. (2018). Hunting for cultivable *Micromonospora* strains in soils of the Atacama Desert. *Antonie van*

- Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(8), 1375-1387. <https://doi.org/10.1007/S10482-018-1049-1>
- Carvalho, B. S., & Rustici, G. (2013). The challenges of delivering bioinformatics training in the analysis of high-throughput data. *Briefings in Bioinformatics*, 14(5), 538-547. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBT018>
- Castro, J., Fernández-Ondoño, E., Rodríguez, C., Lallena, A. M., Sierra, M., & Aguilar, J. (2008). Effects of different olive-grove management systems on the organic carbon and nitrogen content of the soil in Jaén (Spain). *Soil and Tillage Research*, 98(1), 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.10.002>
- Celik, I., Gunal, H., Budak, M., & Akpinar, C. (2010). Effects of long-term organic and mineral fertilizers on bulk density and penetration resistance in semi-arid Mediterranean soil conditions. *Geoderma*, 160(2), 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.09.028>
- Celik, I., Ortas, I., & Kilic, S. (2004). Effects of compost, mycorrhiza, manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxerert soil. *Soil and Tillage Research*, 78(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.02.012>
- Chatterjee, Samprit., & Hadi S., A. (1979). *Regression Analysis by Example*. (Vol. 142, Número 4). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.2307/2982566>
- Chatzistathis, T., Papadakis, I. E., Papaioannou, A., Chatzissavidis, C., & Giannakoula, A. (2020). Comparative study effects between manure application and a controlled-release fertilizer on the growth, nutrient uptake, photosystem II activity and photosynthetic rate of *Olea europaea* L. (cv. 'Koroneiki'). *Scientia Horticulturae*, 264, 109176. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109176>

- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H. R., Guillou, L., Arrouays, D., & Ranjard, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS ONE*, *6*(9), e24166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024166>
- Chen, H., Xia, Q., Yang, T., & Shi, W. (2018). Eighteen-year farming management moderately shapes the soil microbial community structure but promotes habitat-specific taxa. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1776. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01776>
- Chernov, T. I., & Semenov, M. V. (2021). Management of soil microbial communities: Opportunities and prospects (a review). *Eurasian Soil Science*, *54*(12), 1888-1902. <https://doi.org/10.1134/S1064229321120024>
- Chi, F., Shen, S. H., Cheng, H. P., Jing, Y. X., Yanni, Y. G., & Dazzo, F. B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 7271. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005>
- Chollet, F., & Allaire, J. J. (2018). *Deep Learning in R* (Vol. 1, Número 7080). Manning Publications Co. <https://www.manning.com/books/deep-learning-with-r>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, *15*(3), 799-821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Cobo-Díaz, J. F., Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Robles, A. B., Toro, N., & Fernández-López, M. (2015). Metagenomic assessment of the potential

- microbial nitrogen pathways in the rhizosphere of a Mediterranean forest after a wildfire. *Microbial Ecology*, *69*(4), 895-904. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0586-7>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D633-D642. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1244>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29-37. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2019.03.004>
- Connon, S. A., & Giovannoni, S. J. (2002). High-Throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(8), 3878. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3878-3885.2002>
- Connor, D. J., Gómez-Del-Campo, M., Rousseaux, M. C., & Searles, P. S. (2014). Structure, management and productivity of hedgerow olive orchards: A review. *Scientia Horticulturae*, *169*, 71-93. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.010>
- Cope-Selby, N., Cookson, A., Squance, M., Donnison, I., Flavell, R., & Farrar, K. (2017). Endophytic bacteria in *Miscanthus* seed: Implications for germination, vertical

- inheritance of endophytes, plant evolution and breeding. *GCB Bioenergy*, 9(1), 57-77. <https://doi.org/10.1111/GCBB.12364>
- Correa-Galeote, D., Bedmar, E. J., Fernández-González, A. J., Fernández-López, M., & Arone, G. J. (2016). Bacterial communities in the rhizosphere of amilaceous maize (*Zea mays* L.) as assessed by pyrosequencing. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01016>
- Costa, D., Fernandes, T., Martins, F., Pereira, J. A., Tavares, R. M., Santos, P. M., Baptista, P., & Lino-Neto, T. (2021). Illuminating *Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research*, 245, 126693. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126693>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C., & Bik, H. M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(9), 1008-1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- Cross, K. L., Campbell, J. H., Balachandran, M., Campbell, A. G., Cooper, S. J., Griffen, A., Heaton, M., Joshi, S., Klingeman, D., Leys, E., Yang, Z., Parks, J. M., & Podar, M. (2019). Targeted isolation and cultivation of uncultivated bacteria by reverse genomics. *Nature Biotechnology*, 37(11), 1314-1321. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0260-6>
- Crystal-Ornelas, R., Thapa, R., & Tully, K. L. (2021). Soil organic carbon is affected by organic amendments, conservation tillage, and cover cropping in organic farming systems: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 312, 107356. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2021.107356>

- Curiel Yuste, J., Barba, J., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Mattana, S., Martinez-Vilalta, J., Nolis, P., & Lloret, F. (2012). Changes in soil bacterial community triggered by drought-induced gap succession preceded changes in soil C stocks and quality. *Ecology and Evolution*, 2(12), 3016-3031. <https://doi.org/10.1002/ece3.409>
- Curiel Yuste, J., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., & Lloret, F. (2014). Functional diversification within bacterial lineages promotes wide functional overlapping between taxonomic groups in a Mediterranean forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 54-67. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12373>
- Curiel Yuste, J., Fernandez-Gonzalez, A. J., Fernandez-Lopez, M., Ogaya, R., Penuelas, J., Sardans, J., & Lloret, F. (2014). Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.045>
- Dadrasnia, A., de Bona Muñoz, I., Yáñez, E. H., Lamkaddam, I. U., Mora, M., Ponsá, S., Ahmed, M., Argelaguet, L. L., Williams, P. M., & Oatley-Radcliffe, D. L. (2021). Sustainable nutrient recovery from animal manure: A review of current best practice technology and the potential for freeze concentration. *Journal of Cleaner Production*, 315, 128106. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128106>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., Von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by

- Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504-509.  
<https://doi.org/10.1038/nature16461>
- Das, S., Jeong, S. T., Das, S., & Kim, P. J. (2017). Composted cattle manure increases microbial activity and soil fertility more than composted swine manure in a submerged rice paddy. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1702.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01702>
- DeBruyn, J. M., Nixon, L. T., Fawaz, M. N., Johnson, A. M., & Radosevich, M. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6295-6300.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.05005-11>
- Deng, Y., Jiang, Y. H., Yang, Y., He, Z., Luo, F., & Zhou, J. (2012). Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 113.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-113>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., Figueiredo, C., Santos, C., & Silva, A. M. S. (2021). Phenolic and lipophilic metabolite adjustments in *Olea europaea* (olive) trees during drought stress and recovery. *Phytochemistry*, 185, 112695.  
<https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2021.112695>
- Diez, C. M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., & Gaut, B. S. (2015). Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*, 206(1), 436-447. <https://doi.org/10.1111/NPH.13181>
- Dif, G., Belaoui, H. A., Goudjal, Y., Yekkour, A., Djemouai, N., & Zitouni, A. (2021). Potential for plant growth promotion of *Kocuria arsenatis* Strain ST19 on tomato under salt stress conditions. *South African Journal of Botany*, 138, 94-104.  
<https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2020.12.014>

- Dinno, A. (2015). Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. *Stata Journal*, 15(1), 292-300. <https://doi.org/10.1177/1536867X1501500117>
- Dinno, A. (2022). *Dunn's test of multiple comparisons using rank sums*. <https://cran.r-project.org/package=dunn.test>
- Dominati, E., Patterson, M., & Mackay, A. (2010). A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics*, 69(9), 1858-1868. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLECON.2010.05.002>
- Edgar, R. C., & Bateman, A. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ461>
- Edlinger, A., Garland, G., Hartman, K., Banerjee, S., Degrune, F., García-Palacios, P., Hallin, S., Valzano-Held, A., Herzog, C., Jansa, J., Kost, E., Maestre, F. T., Pescador, D. S., Philippot, L., Rillig, M. C., Romdhane, S., Saghai, A., Spor, A., Frossard, E., & van der Heijden, M. G. A. (2022). Agricultural management and pesticide use reduce the functioning of beneficial plant symbionts. *Nature Ecology & Evolution*, 6(8), 1145-1154. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01799-8>
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J. C., Vangronsveld, J., & Weyens, N. (2015). Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial Biotechnology*, 8(4), 707-715. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12291>
- EIP-AGRI Focus Group. (2020). *Pests and diseases of the olive tree*.

- El-Nakeeb, M. A., & Lechevalier, H. A. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 11(2), 75. <https://doi.org/10.1128/AM.11.2.75-77.1963>
- Engelbrektson, A., Kunin, V., Engelbrektson, A., Kunin, V., Glavina del Rio, T., Hugenholtz, P., & Tringe, S. G. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Estaki, M., Jiang, L., Bokulich, N. A., McDonald, D., González, A., Kosciolk, T., Martino, C., Zhu, Q., Birmingham, A., Vázquez-Baeza, Y., Dillon, M. R., Bolyen, E., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2020). QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e100. <https://doi.org/10.1002/CPBI.100>
- European Commission. (2023). *Soil health*. European Commission. [https://environment.ec.europa.eu/topics/soil-and-land/soil-health\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/soil-and-land/soil-health_en)
- European Commission. (2021). *A long-term vision for the EU's Rural Areas—Towards stronger, connected, resilient and prosperous rural areas by 2040* (OECD Rural Studies). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM%3A2021%3A345%3AFIN&qid=1625178285970>
- European Parliamentary Research Service. (2025). *Sustainable use of plant protection products*.
- Fan, J., Han, F., & Liu, H. (2014). Challenges of Big Data analysis. *National Science Review*, 1(2), 293-314. <https://doi.org/10.1093/NSR/NWT032>
- FAO. *FAOSTAT, production statistics*. (2019). <http://faostat.fao.org>

- Fausto, C., Mininni, A. N., Sofo, A., Crecchio, C., Scagliola, M., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (2018). Olive orchard microbiome: Characterisation of bacterial communities in soil-plant compartments and their comparison between sustainable and conventional soil management systems. *Plant Ecology and Diversity*, *11*(5-6), 597-610. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1596172>
- Fernandes-Silva, A. A., Ferreira, T. C., Correia, C. M., Malheiro, A. C., & Villalobos, F. J. (2010). Influence of different irrigation regimes on crop yield and water use efficiency of olive. *Plant and Soil*, *333*(1), 35-47. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0294-5>
- Fernández Gutiérrez, A., & Segura Carretero, A. (2009). *El aceite de oliva virgen: Tesoro de Andalucía*. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja.
- Fernández, J. E. (2014). Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environmental and Experimental Botany*, *103*, 158-179. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2013.12.003>
- Fernández-González, A. J., Cardoni, M., Gómez-Lama Cabanás, C. G. L., Valverde-Corredor, A., Villadas, P. J., Fernández-López, M., & Mercado-Blanco, J. (2020). Linking belowground microbial network changes to different tolerance level towards Verticillium wilt of olive. *Microbiome*, *8*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-0787-2>
- Fernández-González, A. J., Lasa, A. V., Cobo-Díaz, J. F., Villadas, P. J., Pérez-Luque, A. J., García-Rodríguez, F. M., Tringe, S. G., & Fernández-López, M. (2023). Long-Term persistence of three microbial wildfire biomarkers in forest soils. *Forests*, *14*(7), 1383. <https://doi.org/10.3390/F14071383>

- Fernández-González, A. J., Martínez-Hidalgo, P., Cobo-Díaz, J. F., Villadas, P. J., Martínez-Molina, E., Toro, N., Tringe, S. G., & Fernández-López, M. (2017). The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: Potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06112-3>
- Fernández-González, A. J., Ramírez-Tejero, J. A., Nevado-Berzosa, M. P., Luque, F., Fernández-López, M., & Mercado-Blanco, J. (2021). Coupling the endophytic microbiome with the host transcriptome in olive roots. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 4777-4789. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.035>
- Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Díaz-Peña, F., Notario-del-Pino, J., Lizano-Bastardín, Á., Fernández-López, M., & León-Barrios, M. (2023). Key microorganisms defining the microbial communities of an alpine legume-shrubland ecosystem on a volcanic island in natural and fire-affected soils. *Plant and Soil*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/S11104-023-06465-X>
- Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., Belaj, A., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2019). Defining the root endosphere and rhizosphere microbiomes from the World Olive Germplasm Collection. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56977-9>
- Fernández-González, A. J., Wentzien, N. M., Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Lasa, A. V., Cabanás, C. G. L., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2020). Comparative study of neighboring Holm oak and olive trees-belowground

- microbial communities subjected to different soil management. *PLOS ONE*, 15(8), e0236796. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0236796>
- Ferreira, C. S. S., Seifollahi-Aghmiuni, S., Destouni, G., Ghajarnia, N., & Kalantari, Z. (2022). Soil degradation in the European Mediterranean region: Processes, status and consequences. *Science of The Total Environment*, 805, 150106. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150106>
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626-631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Figueiredo, D. D., & Köhler, C. (2018). Auxin: A molecular trigger of seed development. *Genes & development*, 32(7-8), 479-490. <https://doi.org/10.1101/GAD.312546.118>
- Fort, T., Pauvert, C., Zanne, A. E., Ovaskainen, O., Caignard, T., Barret, M., Compant, S., Hampe, A., Delzon, S., & Vacher, C. (2021). Maternal effects shape the seed mycobiome in *Quercus petraea*. *New Phytologist*, 230(4), 1594-1608. <https://doi.org/10.1111/NPH.17153>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2016). *An R Companion to Applied Regression*. SAGE publications.
- Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F., & Reitz, T. (2016). Mineral vs. Organic amendments: Microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01446>

- French, E., Kaplan, I., Iyer-Pascuzzi, A., Nakatsu, C. H., & Enders, L. (2021). Emerging strategies for precision microbiome management in diverse agroecosystems. *Nature Plants*, 7(3), 256-267. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00830-9>
- Gabel, V. M., Meier, M. S., Köpke, U., & Stolze, M. (2016). The challenges of including impacts on biodiversity in agricultural life cycle assessments. *Journal of Environmental Management*, 181, 249-260. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.030>
- Galán-Martín, Á., Contreras, M. del M., Romero, I., Ruiz, E., Bueno-Rodríguez, S., Eliche-Quesada, D., & Castro-Galiano, E. (2022). The potential role of olive groves to deliver carbon dioxide removal in a carbon-neutral Europe: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 165, 112609. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2022.112609>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 243-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- García-Orenes, F., Morugán-Coronado, A., Zornoza, R., & Scow, K. (2013). Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a Mediterranean agro-ecosystem. *PLoS ONE*, 8(11), e80522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080522>
- García-Ruiz, J. M., Nadal-Romero, E., Lana-Renault, N., & Beguería, S. (2013). Erosion in Mediterranean landscapes: Changes and future challenges. *Geomorphology*, 198, 20-36. <https://doi.org/10.1016/J.GEOMORPH.2013.05.023>

- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilpr, S. A., & Young, J. P. W. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*, 2037-2048.
- Gharbi, Y., Barkallah, M., Bouazizi, E., Hibar, K., Gdoura, R., & Triki, M. A. (2017). Lignification, phenols accumulation, induction of PR proteins and antioxidant-related enzymes are key factors in the resistance of *Olea europaea* to *Verticillium* wilt of olive. *Acta Physiologiae Plantarum*, *39*(2), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2343-z>
- Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Hezbri, K., Lundstedt, E., D'Angelo, T., McNutt, Z., Laplaze, L., Gherbi, H., Vaissayre, V., Svistoonoff, S., Ahmed, H. ben, Boudabous, A., & Tisa, L. S. (2019). The plant-growth-promoting actinobacteria of the genus *Nocardia* induces root nodule formation in *Casuarina glauca*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *112*(1), 75-90. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1147-0>
- Giampetruzzi, A., Baptista, P., Morelli, M., Cameirão, C., Neto, T. L., Costa, D., D'attoma, G., Kubaa, R. A., Altamura, G., Saponari, M., Pereira, J. A., & Saldarelli, P. (2020). Differences in the endophytic microbiome of olive cultivars infected by *Xylella fastidiosa* across seasons. *Pathogens*, *9*(9), 723. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9090723>
- Giorgi, F. M., Ceraolo, C., & Mercatelli, D. (2022). The R language: An engine for bioinformatics and data science. *Life*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/life12050648>

- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 237-245. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2015.03.007>
- Goggin, D. E., Emery, R. J. N., Kurepin, L. V., & Powles, S. B. (2015). A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Annals of Botany*, 115(2), 293-301. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCU231>
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Diaporthe: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 1-41. <https://doi.org/10.3767/003158513x666844>
- Gómez-Lama Cabanás, C., Ruano-Rosa, D., Legarda, G., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Triviño, J., Roca, A., & Mercado-Blanco, J. (2018). Bacillales members from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture*, 8(7), 90. <https://doi.org/10.3390/agriculture8070090>
- Gómez-Lama Cabanás, C., Wentzien, N. M., Zorrilla-Fontanesi, Y., Valverde-Corredor, A., Fernández-González, A. J., Fernández-López, M., & Mercado-Blanco, J. (2022). Impacts of the biocontrol strain *Pseudomonas simiae* PICF7 on the banana holobiont: Alteration of root microbial co-occurrence networks and effect on host defense responses. *Frontiers in Microbiology*, 13, 809126. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.809126>

- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, *17*(6), 333-351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gossner, M. M., Lewinsohn, T. M., Kahl, T., Grassein, F., Boch, S., Prati, D., Birkhofer, K., Renner, S. C., Sikorski, J., Wubet, T., Arndt, H., Baumgartner, V., Blaser, S., Blüthgen, N., Börschig, C., Buscot, F., Dlekötter, T., Jorge, L. R., Jung, K., ... Allan, E. (2016). Land-use intensification causes multitrophic homogenization of grassland communities. *Nature*, *540*(7632), 266-269. <https://doi.org/10.1038/nature20575>
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2014). Delineating *Kocuria turfanesis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 566-576. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.871650>
- Griffiths, R. I., Thomson, B. C., James, P., Bell, T., Bailey, M., & Whiteley, A. S. (2011). The bacterial biogeography of British soils. *Environmental Microbiology*, *13*(6), 1642-1654. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02480.x>
- Gu, B., Zhang, L., Dingenen, R. V., Vieno, M., Grinsven, H. J. V., Zhang, X., Zhang, S., Chen, Y., Wang, S., Ren, C., Rao, S., Holland, M., Winiwarter, W., Chen, D., Xu, J., & Sutton, M. A. (2021). Abating ammonia is more cost-effective than nitrogen oxides for mitigating PM2.5 air pollution. *Science*, *374*(6568), 758-762. <https://doi.org/10.1126/science.abf8623>
- Guerrero-Casado, J., Carpio, A. J., Tortosa, F. S., & Villanueva, A. J. (2021). Environmental challenges of intensive woody crops: The case of super high-density olive groves.

- Science of The Total Environment*, 798, 149212.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149212>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.  
<https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYQ010>
- Guo, L., Luo, X., Li, M., Joldersma, D., Plunkert, M., & Liu, Z. (2022). Mechanism of fertilization-induced auxin synthesis in the endosperm for seed and fruit development. *Nature communications*, 13(1), 3985.  
<https://doi.org/10.1038/S41467-022-31656-Y>
- Gustavsen, J. A., Pai, S., Isserlin, R., Demchak, B., Pico, A. R., Denvir, J., & Bhuvaneshwar, K. (2019). RCy3: Network biology using Cytoscape from within R. *F1000Research*, 8, 1774. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20887.3>
- Guzmán, G., Boumahdi, A., & Gómez, J. A. (2022). Expansion of olive orchards and their impact on the cultivation and landscape through a case study in the countryside of Cordoba (Spain). *Land Use Policy*, 116, 106065.  
<https://doi.org/10.1016/J.LANDUSEPOL.2022.106065>
- Hadawi, I., Safari, M., & Arji, I. (2021). Effects of different organic manures and chemical fertilizers on yield and yield component of olive (*Olea europaea* L.) cv Zard in Kermanshah province. *Agrotechniques in Industrial Crops*, 1(2), 61-70.  
<https://doi.org/10.22126/ATIC.2021.6514.1013>
- Hagedorn, C., & Holt, J. G. (1975). A nutritional and taxonomic survey of *Arthrobacter* soil isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(3), 353-361.  
<https://doi.org/10.1139/M75-050>

- Hakimzadeh, A., Abdala Asbun, A., Albanese, D., Bernard, M., Buchner, D., Callahan, B., Caporaso, J. G., Curd, E., Djemiel, C., Brandström Durling, M., Elbrecht, V., Gold, Z., Gweon, H. S., Hajibabaei, M., Hildebrand, F., Mikryukov, V., Normandeau, E., Özkurt, E., M. Palmer, J., ... Anslan, S. (2023). A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyses. *Molecular ecology resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13847>
- Hamayun, M., Afzal Khan, S., Ahmad, N., Tang, D. S., Kang, S. M., Na, C. I., Sohn, E. Y., Hwang, Y. H., Shin, D. H., Lee, B. H., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2009). *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 627-632. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9982-9>
- Han, S., Zeng, L., Luo, X., Xiong, X., Wen, S., Wang, B., Chen, W., & Huang, Q. (2018). Shifts in Nitrobacter- and Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacterial communities under long-term fertilization practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 124, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.033>
- Harder Nielsen, T., Bonde, T. A., & Sørensen, J. (1998). Significance of microbial urea turnover in N cycling of three Danish agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 25(2), 147-157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00468.x>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320. <https://doi.org/10.1128/mubr.00050-14>

- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Harsonowati, W., Marian, M., Surono, & Narisawa, K. (2020). The Effectiveness of a dark septate endophytic fungus, *Cladophialophora chaetospora* SK51, to mitigate strawberry Fusarium wilt disease and with growth promotion activities. *Frontiers in Microbiology*, 11, 585. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00585>
- Hartman, K., van der Heijden, M. G. A., Wittwer, R. A., Banerjee, S., Walser, J. C., & Schlaeppli, K. (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*, 6(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9>
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., & Widmer, F. (2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME Journal*, 9(5), 1177-1194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>
- Hassan, A., Haggag, L. F., Hassan, H., Abdelhafez, A. A., & Hassan, A. M. (2015). Effect of mineral and bio-fertilization on yield and fruit quality of Manzanillo Olive trees. *International Journal of ChemTech Research*, 8(11), 63-73.
- Hassani, A., Azapagic, A., & Shokri, N. (2021). Global predictions of primary soil salinization under changing climate in the 21st century. *Nature Communications*, 12(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26907-3>
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1989). A new method for the intensive isolation of Actinomycetes from soil. *Actinomycetologica*, 3(2), 95-104. [https://doi.org/10.3209/SAJ.3\\_95](https://doi.org/10.3209/SAJ.3_95)

- Hayakawa, M., Otaguro, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T., & Iimura, Y. (2000). Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie van Leeuwenhoek*, *78*(2), 171-185. <https://doi.org/10.1023/A:1026579426265>
- He, Z. Y., Sun, A., Jiao, X. Y., Ge, A. H., Hu, H. W., Jin, S., Liu, X., Lin, Y., & He, J. Z. (2022). Fertilization has a greater effect than rhizosphere on community structures of comammox Nitrospira in an alkaline agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, *175*, 104456. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104456>
- Heitmann, S., Bergmann, G. E., Barge, E., Ridout, M., Newcombe, G., & Busby, P. E. (2021). Culturable seed microbiota of Populus Trichocarpa. *Pathogens*, *10*(6), 653. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10060653>
- Hernandez-Agreda, A., Gates, R. D., & Ainsworth, T. D. (2017). Defining the core microbiome in corals' microbial soup. *Trends in microbiology*, *25*(2), 125-140. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.11.003>
- Herrera-Medina, M. J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J. A., & García Garrido, J. M. (2007). Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, *175*(3), 554-564. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02107.x>
- Hirsch, C. F., & Christensen, D. L. (1983). Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, *46*(4), 925. <https://doi.org/10.1128/AEM.46.4.925-929.1983>
- Holmes, A. J., Bowyer, J., Holley, M. P., O'Donoghue, M., Montgomery, M., & Gillings, M. R. (2006). Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision

- of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(2), 111-120. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00733.x>
- Hone, H., Mann, R., Yang, G., Kaur, J., Tannenbaum, I., Li, T., Spangenberg, G., & Sawbridge, T. (2021). Profiling, isolation and characterisation of beneficial microbes from the seed microbiomes of drought tolerant wheat. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91351-8>
- Hu, J., Zhao, Y., Yao, X., Wang, J., Zheng, P., Xi, C., & Hu, B. (2021). Dominance of comammox Nitrospira in soil nitrification. *Science of the Total Environment*, 780, 146558. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146558>
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research*, 17(3), 377. <https://doi.org/10.1101/GR.5969107>
- Ibragimova, M. V., Rumyantseva, M. L., Onishchuk, O. P., Belova, V. S., Kurchak, O. N., Andronov, E. E., Dzyubenko, N. I., & Simarov, B. V. (2006). Symbiosis between the root-nodule bacterium Sinorhizobium meliloti and alfalfa (Medicago sativa) under salinization conditions. *Microbiology*, 75(1), 77-81. <https://doi.org/10.1134/S0026261706010140>
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—Evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 666-677. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>
- Inserm. (2021). *Inserm latest collective expert review on the health effects of pesticides*. <https://presse.inserm.fr/en/inserm-publishes-its-latest-collective-expert-review-on-the-health-effects-of-pesticides/60325/>

- Jacobsen, C. S., & Hjelmsø, M. H. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 15-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003>
- Jayaraj, R. L., Rodriguez, E. A., Wang, Y., & Block, M. L. (2017). Outdoor ambient air pollution and neurodegenerative diseases: The neuroinflammation hypothesis. *Current environmental health reports*, 4(2), 166-179.  
<https://doi.org/10.1007/s40572-017-0142-3>
- Jeanbille, M., Buée, M., Bach, C., Cébron, A., Frey-Klett, P., Turpault, M. P., & Uroz, S. (2016). Soil parameters drive the structure, diversity and metabolic potentials of the bacterial communities across temperate beech forest soil sequences. *Microbial Ecology*, 71(2), 482-493. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0669-5>
- Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. de la O., Cabanás, C. G. L., Barroso, J. B., Luque, F., & Mercado-Blanco, J. (2019). The transcriptome of *Verticillium dahliae* responds differentially depending on the disease susceptibility level of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar. *Genes*, 10(4), 1-19.  
<https://doi.org/10.3390/genes10040251>
- Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. de la O., Gómez-Lama Cabanás, C., Barroso, J. B., Luque, F., & Mercado-Blanco, J. (2019). The transcriptome of *Verticillium dahliae* responds differentially depending on the disease susceptibility level of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar. *Genes*, 10(4), 251.  
<https://doi.org/10.3390/genes10040251>
- Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. de la O., Schilirò, E., Barroso, J. B., Bombarely, A., Mueller, L., Mercado-Blanco, J., & Luque, F. (2017). Transcriptomic analysis of

- Olea europaea L. roots during the Verticillium dahliae early infection process. *The Plant Genome*, 10(1). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2016.07.0060>
- Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. de la O., Schilirò, E., Barroso, J. B., Bombarely, A., Mueller, L., Mercado-Blanco, J., & Luque, F. (2017). Transcriptomic analysis of Olea europaea L. roots during the Verticillium dahliae early infection process. *The Plant Genome*, 10(1), plantgenome2016.07.0060. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2016.07.0060>
- Jung, J., Kim, J. S., Taffner, J., Berg, G., & Ryu, C. M. (2020). Archaea, tiny helpers of land plants. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2494-2500. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.09.005>
- Kakagianni, M., Tsiknia, M., Feka, M., Vasileiadis, S., Leontidou, K., Kavroulakis, N., Karamanoli, K., Karpouzas, D. G., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2023). Above- and below-ground microbiome in the annual developmental cycle of two olive tree varieties. *FEMS Microbes*, 4, xtad001. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad001>
- Kandhol, N., Pandey, S., Singh, V. P., Herrera-Estrella, L., Bucio, J. L., Tran, L. S. P., & Tripathi, D. K. (2023). Bacterial community and root endodermis: A complementary relationship. *Trends in Plant Science*, 28(7), 749-751. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2023.03.021>
- Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G. J., You, Y. H., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2012). Gibberellin-producing Promicromonospora sp. SE188 improves Solanum lycopersicum plant growth and influences endogenous plant hormones. *Journal of Microbiology*, 50(6), 902-909. <https://doi.org/10.1007/S12275-012-2273-4>

- Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J. F., Khadari, B., & Besnard, G. (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: Palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*, 87(4), 885-899. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2012.00229.X>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MST010>
- Kielak, A. M., Cretoiu, M. S., Semenov, A. V., Sørensen, S. J., & Van Elsas, J. D. (2013). Bacterial chitinolytic communities respond to chitin and pH alteration in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 263-272. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-12>
- Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity, and management of verticillium species. *Annual review of phytopathology*, 47, 39-62. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080508-081748>
- Knight, R., Vrbanc, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature reviews. Microbiology*, 16(7), 410-422. <https://doi.org/10.1038/S41579-018-0029-9>
- Krueger, F., Andrews, S. R., & Osborne, C. S. (2011). Large scale loss of data in low-diversity Illumina sequencing libraries can be recovered by deferred cluster

- calling. *PLOS ONE*, 6(1), e16607.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016607>
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-generation sequencing and emerging technologies. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 45(7), 661-673.  
<https://doi.org/10.1055/S-0039-1688446>
- Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., Veen, J. A., & Kowalchuk, G. A. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 12-24.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>
- Kusstatscher, P., Adam, E., Wicaksono, W. A., Bernhart, M., Olimi, E., Müller, H., & Berg, G. (2021). Microbiome-assisted breeding to understand cultivar-dependent assembly in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 505.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.642027>
- Küster, E., & Williams, S. T. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, 202(4935), 928-929. <https://doi.org/10.1038/202928A0>
- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., & Li, W. (1996). *Applied linear statistical models*. McGraw-Hill/Irwin.
- Labouyrie, M., Ballabio, C., Romero, F., Panagos, P., Jones, A., Schmid, M. W., Mikryukov, V., Dulya, O., Tedersoo, L., Bahram, M., Lugato, E., van der Heijden, M. G. A., & Orgiazzi, A. (2023). Patterns in soil microbial diversity across Europe. *Nature Communications*, 14(1), 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37937-4>
- Laconi, A., Mughini-Gras, L., Tolosi, R., Grilli, G., Trocino, A., Carraro, L., Di Cesare, F., Cagnardi, P., & Piccirillo, A. (2021). Microbial community composition and antimicrobial resistance in agricultural soils fertilized with livestock manure from

- conventional farming in Northern Italy. *Science of the Total Environment*, 760, 143404. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143404>
- Lahkim, L. T. (2011). Epidemiology and control of Verticillium wilt on olive. *Israel Journal of Plant Sciences*, 59(1), 59-69. <https://doi.org/10.1560/IJPS.59.1.59>
- Lal, R. (2010). Managing soils and ecosystems for mitigating anthropogenic carbon emissions and advancing global food security. *BioScience*, 60(9), 708-721. <https://doi.org/10.1525/BIO.2010.60.9.8>
- Landa, B. B., Montes-Borrego, M., Aranda, S., Soriano, M. A., Gómez, J. A., & Navas-Cortés, J. A. (2014). Soil factors involved in the diversity and structure of soil bacterial communities in commercial organic olive orchards in Southern Spain. *Environmental Microbiology Reports*, 6(2), 196-207. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12148>
- Langgut, D., Cheddadi, R., Carrión, J. S., Cavanagh, M., Colombaroli, D., Eastwood, W. J., Greenberg, R., Litt, T., Mercuri, A. M., Miebach, A., Roberts, C. N., Woldring, H., & Woodbridge, J. (2019). The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. *The Holocene*, 29(5), 902-922. <https://doi.org/10.1177/0959683619826654>
- Larbi, A., Kchaou, H., Gaaliche, B., Gargouri, K., Boulal, H., & Morales, F. (2020). Supplementary potassium and calcium improves salt tolerance in olive plants. *Scientia Horticulturae*, 260, 108912. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.108912>
- Larsbrink, J., & McKee, L. S. (2020). Bacteroidetes bacteria in the soil: Glycan acquisition, enzyme secretion, and gliding motility. *Advances in Applied Microbiology*, 110, 63-98. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.11.001>

- Lasa, A. V. (2019). *Estudio de la diversidad procariótica y caracterización taxonómica y funcional de las bacterias asociadas a la raíz de roble melojo (Quercus pyrenaica Willd.) y de leguminosas forrajeras del Espacio Natural de Sierra Nevada* [Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/57688>
- Lasa, A. V., Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Cobo-Díaz, J. F., & Fernández-López, M. (2023). Bacterial inoculation of *Quercus pyrenaica* trees alters co-occurrence patterns but not the composition of the rhizosphere bacteriome in wild conditions. *Environmental Microbiology*, 25(9), 1747-1761. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16388>
- Lathi, L., & Shetty, S. (2017). *Tools for microbiome analysis in R. Microbiome package version*. Bioconductor. <https://microbiome.github.io/tutorials/>
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>
- Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Aanderud, Z., Lennon, J., & Fierer, N. (2013). Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME Journal*, 7(8), 1641-1650. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.50>
- Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Lundberg, D. S., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., Malfatti, S., Del Rio, T. G., Jones, C. D., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2015). Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, 349(6250), 860-864. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8764>
- Lee, D. H., Ra, J. S., Kim, M. J., & Kim, S. B. (2022). *Micromonospora antibiotica* sp. Nov. And *Micromonospora humidisoli* sp. Nov., two new actinobacterial species

- exhibiting antimicrobial potential. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(10), 005522.  
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005522>
- Lee, S. A., Kim, J. M., Kim, Y., Joa, J. H., Kang, S. S., Ahn, J. H., Kim, M., Song, J., & Weon, H. Y. (2020). Different types of agricultural land use drive distinct soil bacterial communities. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74193-8>
- Levin, A. G., Lavee, S., & Tsrur, L. (2003). Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology*, 52(2), 212-218. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3059.2003.00809.X>
- Lewis, W. H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D. Z., & Ettema, T. J. G. (2020). Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature*, 19(4), 225-240. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00458-8>
- Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., & Springael, D. (2004). Occurrence and Phylogenetic Diversity of Sphingomonas Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1944-1955. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1944-1955.2004>
- Leyva-Pérez, M. de la O., Jiménez-Ruiz, J., Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., Barroso, J. B., Luque, F., & Mercado-Blanco, J. (2018). Tolerance of olive (*Olea europaea*) cv Frantoio to *Verticillium dahliae* relies on both basal and pathogen-induced differential transcriptomic responses. *The New phytologist*, 217(2), 671-686. <https://doi.org/10.1111/NPH.14833>

- Li, C., Hu, H. W., Chen, Q. L., Yan, Z. Z., Thi Nguyen, B. A., Chen, D., & He, J. Z. (2021). Niche specialization of comammox Nitrospira clade A in terrestrial ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, *156*, 108231. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108231>
- Li, G., Kusari, S., Kusari, P., Kayser, O., & Spiteller, M. (2015). Endophytic Diaporthe sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. *Journal of Natural Products*, *78*(8), 2128-2132. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00170>
- Li, H., Luo, N., Ji, C., Li, J., Zhang, L., Xiao, L., She, X., Liu, Z., Li, Y., Liu, C., Guo, Q., & Lai, H. (2021). Liquid organic fertilizer amendment alters rhizosphere microbial community structure and co-occurrence patterns and improves sunflower yield under salinity-alkalinity stress. *Microbial Ecology*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01870-0>
- Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., Yang, X., & Li, C. (2020). Evaluation of seven chemical pesticides by mixed microbial culture (PCS-1): Degradation ability, microbial community, and Medicago sativa phytotoxicity. *Journal of Hazardous Materials*, *389*, 121834. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121834>
- Li, J., Cooper, J. M., Lin, Z., Li, Y., Yang, X., & Zhao, B. (2015). Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain. *Applied Soil Ecology*, *96*, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.07.001>
- Li, S., Lian, W. H., Han, J. R., Ali, M., Lin, Z. L., Liu, Y. H., Li, L., Zhang, D. Y., Jiang, X. Z., Li, W. J., & Dong, L. (2023). Capturing the microbial dark matter in desert soils using culturomics-based metagenomics and high-resolution analysis. *npj Biofilms and Microbiomes*, *9*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00439-8>

- Li, X., Bond, P. L., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., & Huang, L. (2015). From lithotroph- to organotroph-dominant: Directional shift of microbial community in sulphidic tailings during phytostabilization. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep12978>
- Liang, B., Ma, C., Fan, L., Wang, Y., & Yuan, Y. (2018). Soil amendment alters soil physicochemical properties and bacterial community structure of a replanted apple orchard. *Microbiological Research*, 216, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.010>
- Liang, Y., Wu, L., Clark, I. M., Xue, K., Yang, Y., van Nostrand, J. D., Deng, Y., He, Z., McGrath, S., Storkey, J., Hirsch, P. R., Sun, B., & Zhou, J. (2015). Over 150 years of long-term fertilization alters spatial scaling of microbial biodiversity. *mBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00240-15>
- Lin, H., & Peddada, S. D. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
- Ling, N., Zhu, C., Xue, C., Chen, H., Duan, Y., Peng, C., Guo, S., & Shen, Q. (2016). Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.005>
- Lipshitz, N., Gophna, R., Hartman, M., & Biger, G. (1991). The beginning of olive (olea europaea) cultivation in the old world: A reassessment. *Journal of Archaeological Science*, 18(4), 441-453. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90037-P](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90037-P)
- Liu, Z., Guo, Q., Feng, Z., Liu, Z., Li, H., Sun, Y., Liu, C., & Lai, H. (2020). Long-term organic fertilization improves the productivity of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.)

- through increasing rhizosphere microbial diversity and network complexity. *Applied Soil Ecology*, 147, 103426. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103426>
- Llimós, M., Segarra, G., Sancho-Adamson, M., Trillas, M. I., & Romanyà, J. (2021). Impact of olive saplings and organic amendments on soil microbial communities and effects of mineral fertilization. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.653027>
- Lo, C. C. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45(5), 348-359. <https://doi.org/10.1080/03601231003799804>
- Logue, J. B., Findlay, S. E. G., & Comte, J. (2015). Editorial: Microbial responses to environmental changes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 172469. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01364/BIBTEX>
- López-Escudero, F. J., & Mercado-Blanco, J. (2011). Verticillium wilt of olive: A case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, 344(1), 1-50. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0629-2>
- Louca, S., Parfrey, L. W., & Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305), 1272-1277. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4507>
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1576. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>

- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2010.133>
- Luan, H., Gao, W., Huang, S., Tang, J., Li, M., Zhang, H., Chen, X., & Masiliūnas, D. (2020). Substitution of manure for chemical fertilizer affects soil microbial community diversity, structure and function in greenhouse vegetable production systems. *PLoS ONE*, 15(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214041>
- Lucas, R. S. (2019). *The effect of increasing temperature on olive trees (Olea europaea L. subsp. Europaea) biology: An integrated morphological, phenological and biomolecular study*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes.
- Lucas, S. T., D'Angelo, E. M., & Williams, M. A. (2014). Improving soil structure by promoting fungal abundance with organic soil amendments. *Applied Soil Ecology*, 75, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.10.002>
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(10), 999-1002. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2634>
- Luo, F., Yang, Y., Zhong, J., Gao, H., Khan, L., Thompson, D. K., & Zhou, J. (2007). Constructing gene co-expression networks and predicting functions of unknown genes by random matrix theory. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 299. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-299>
- Luraschi, J., Kuo, K., & Ruiz, E. (2019). *Mastering Spark with R*. O'Reilly Media, Inc. <https://www.oreilly.com/library/view/mastering-spark-with/9781492046363/>

- Ma, G., Kang, J., Wang, J., Chen, Y., Lu, H., Wang, L., Wang, C., Xie, Y., Ma, D., & Kang, G. (2020). Bacterial community structure and predicted function in wheat soil from the north China plain are closely linked with soil and plant characteristics after seven years of irrigation and nitrogen application. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 506. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00506>
- Maestri, D., Barrionuevo, D., Bodoira, R., Zafra, A., Jiménez-López, J., & Alché, J. de D. (2019). Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea europaea* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(9), 4359. <https://doi.org/10.1007/S13197-019-03904-5>
- Maestro-Gaitán, I., Granado-Rodríguez, S., Redondo-Nieto, M., Battaglia, A., Poza-Viejo, L., Matías, J., Bolaños, L., & Reguera, M. (2023). Unveiling changes in rhizosphere-associated bacteria linked to the genotype and water stress in quinoa. *Microbial Biotechnology*, *16*(12), 2326-2344. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14337>
- Malacrinò, A., Mosca, S., Li Destri Nicosia, M. G., Agosteo, G. E., & Schena, L. (2022). Plant genotype shapes the bacterial microbiome of fruits, leaves, and soil in olive plants. *Plants*, *11*(5), 613. <https://doi.org/10.3390/plants11050613>
- Mapperson, R. R., Kotiw, M., Davis, R. A., & Dearnaley, J. D. W. (2014). The diversity and antimicrobial activity of *preussia* sp. Endophytes isolated from australian dry rainforests. *Current Microbiology*, *68*(1), 30-37. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0415-5>
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers

- that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(2), 795. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Marizzoni, M., Gurry, T., Provasi, S., Greub, G., Lopizzo, N., Ribaldi, F., Festari, C., Mazzelli, M., Mombelli, E., Salvatore, M., Mirabelli, P., Franzese, M., Soricelli, A., Frisoni, G. B., & Cattaneo, A. (2020). Comparison of bioinformatics pipelines and operating systems for the analyses of 16S rRNA gene amplicon sequences in human fecal samples. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1262. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01262>
- Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Paplomatas, E. J., & Tjamos, E. C. (2016). Biological control of Verticillium wilt of olive by Paenibacillus alvei, strain K165. *BioControl*, *61*(3), 293-303. <https://doi.org/10.1007/S10526-015-9669-0>
- Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Roussos, P. A., Paplomatas, E. J., & Tjamos, E. C. (2010). Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating Verticillium dahliae pathotypes. *Plant Disease*, *94*(9), 1156-1162. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1156>
- Márquez-García, F., Hayas, A., Peña, A., Ordóñez-Fernández, R., & González-Sánchez, E. J. (2024). Influence of cover crops and tillage on organic carbon loss in Mediterranean olive orchards. *Soil and Tillage Research*, *235*, 105905. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2023.105905>
- Martí, J. M., Arias-Giraldo, L. F., Díaz-Villanueva, W., Arnau, V., Rodríguez-Franco, A., & Garay, C. P. (2020). Metatranscriptomic dynamics after Verticillium dahliae infection and root damage in Olea europaea. *BMC Plant Biology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2185-0>

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10-12.  
<https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Martinez-Arbizu, P. (2019). *pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis*. <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis>
- Martins, F., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2019). Olive anthracnose and its management by fungal endophytes: An overview. En *Plant Microbe Interface* (pp. 253-269). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-19831-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19831-2_11)
- Martins, F., Pereira, J. A., Bota, P., Bento, A., & Baptista, P. (2016). Fungal endophyte communities in above- and belowground olive tree organs and the effect of season and geographic location on their structures. *Fungal Ecology*, 20, 193-201.  
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.01.005>
- Marwick, B., Boettiger, C., & Mullen, L. (2018). Packaging data analytical work reproducibly using R (and friends). *American Statistician*, 72(1), 80-88.  
<https://doi.org/10.1080/00031305.2017.1375986>
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Campos, M. D., Rei, F., & Félix, M. do R. (2019). Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biology*, 123(1), 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.004>
- Matsumoto, H., Fan, X., Wang, Y., Kusstatscher, P., Duan, J., Wu, S., Chen, S., Qiao, K., Wang, Y., Ma, B., Zhu, G., Hashidoko, Y., Berg, G., Cernava, T., & Wang, M. (2021). Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nature Plants*, 7(1), 60-72. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00826-5>

- 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), e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Mechri, B., Tekaya, M., Hammami, M., & Chehab, H. (2020). Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*). *Biochemical Systematics and Ecology*, *92*, 104112. <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2020.104112>
- Medina, R., Fernández-González, A. J., García-Rodríguez, F. M., Villadas, P. J., Rosso, J. A., Fernández-López, M., & Del Panno, M. T. (2020). Exploring the effect of composting technologies on the recovery of hydrocarbon contaminated soil post chemical oxidative treatment. *Applied Soil Ecology*, *150*, 103459. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2019.103459>
- Medina-Pastor, P., & Triacchini, G. (2020). The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, *18*(4), e06057. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2020.6057>
- Medo, J., Maková, J., Medová, J., Lipková, N., Cinkocki, R., Omelka, R., & Javoreková, S. (2021). Changes in soil microbial community and activity caused by application of dimethachlor and linuron. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91755-6>
- Mei, S., Zhang, M., Ye, J., Du, J., Jiang, Y., & Hu, Y. (2023). Auxin contributes to jasmonate-mediated regulation of abscisic acid signaling during seed germination in

- Arabidopsis. *The Plant cell*, 35(3), 1110-1133.  
<https://doi.org/10.1093/PLCELL/KOAC362>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663.  
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mercado-Blanco, J., Abrantes, I., Caracciolo, A. B., Bevivino, A., Ciancio, A., Grenni, P., Hrynkiewicz, K., Kredics, L., & Proença, D. N. (2018). Belowground microbiota and the health of tree crops. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1006.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01006>
- Mercado-Blanco, J., & Lugtenberg, B. (2014). Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Current Biotechnology*, 3(1), 60-75.  
<https://doi.org/10.2174/22115501113026660038>
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2004). Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30(2), 474-486.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2004.02.002>
- Mina, D., Pereira, J. A., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2020). Screening the olive tree phyllosphere: Search and find potential antagonists against *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. *Frontiers in Microbiology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.02051>
- Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (2023). *Estimación de producción de aceite de oliva en la campaña 2023/2024*.

[https://www.mapa.gob.es/fr/prensa/231009aforoaceiteoliva2324\\_tcm36-661242.pdf](https://www.mapa.gob.es/fr/prensa/231009aforoaceiteoliva2324_tcm36-661242.pdf)

Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, *99*, 110-121. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2013.11.005>

Moffett, B. F., Nicholson, F. A., Uwakwe, N. C., Chambers, B. J., Harris, J. A., & Hill, T. C. J. (2003). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, *43*(1), 13-19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01041.x>

Montes-Borrego, M., Metsis, M., & Landa, B. B. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the olive crop across the Andalusian landscape: Factors driving community differentiation. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096397>

Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2013). Linking microbial functional diversity of olive rhizosphere soil to management systems in commercial orchards in southern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *181*, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.021>

Montes-Osuna, N., Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., Legarda, G., Prieto, P., & Mercado-Blanco, J. (2021). Evaluation of indigenous olive biocontrol rhizobacteria as protectants against drought and salt stress. *Microorganisms*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061209>

Montes-Osuna, N., & Mercado-Blanco, J. (2020). Verticillium wilt of olive and its control: What did we learn during the last decade? *Plants*, *9*(6), 1-31. <https://doi.org/10.3390/plants9060735>

- Moral, J., & Trapero, A. (2009). Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, *93*(10), 1028-1036. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1028>
- Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Cañizares, R., Castro, J., & Benítez, E. (2009). Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *131*(3-4), 333-339. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.02.011>
- Moreno Montesino J & Muñoz-cobo J. (2003). Uso del agroecosistema olivar por las aves. (II) Variables estructurales en la estación otoño-invernal. *Boletín Sanidad Vegetal y Plagas*, *29*, 171-183.
- Morgado, R. (2022). *From traditional to super-intensive: Drivers and biodiversity impacts of olive farming intensification*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16358.29769>
- Morgado, R., Santana, J., Porto, M., Sánchez-Oliver, J. S., Reino, L., Herrera, J. M., Rego, F., Beja, P., & Moreira, F. (2020). A Mediterranean silent spring? The effects of olive farming intensification on breeding bird communities. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *288*, 106694. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2019.106694>
- Morgan, M., Anders, S., Lawrence, M., Aboyoun, P., Pagès, H., & Gentleman, R. (2009). ShortRead: A bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics*, *25*(19), 2607-2608. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp450>
- Mousavi, S., Regni, L., Bocchini, M., Mariotti, R., Cultrera, N. G. M., Mancuso, S., Googiani, J., Chakerolhosseini, M. R., Guerrero, C., Albertini, E., Baldoni, L., & Proietti, P. (2019). Physiological, epigenetic and genetic regulation in some olive

- cultivars under salt stress. *Scientific Reports*, 9(1), 1-17.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37496-5>
- Mueller, U. G., Juenger, T. E., Kardish, M. R., Carlson, A. L., Burns, K. M., Edwards, J. A., Smith, C. C., Fang, C.-C., & Des Marais, D. L. (2021). Artificial selection on microbiomes to breed microbiomes that confer salt tolerance to plants. *mSystems*, 6(6), e01125-21. <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.01125-21>
- Mueller, U. G., & Linksvayer, T. A. (2022). Microbiome breeding: Conceptual and practical issues. *Trends in Microbiology*, 30(10), 997-1011.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2022.04.003>
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., & Joint, I. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal*, 2(4), 379-392.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00138>
- Müller, H., Berg, C., Landa, B. B., Auerbach, A., Moissl-Eichinger, C., & Berg, G. (2015). Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees. *Frontiers in Microbiology*, 6, 138.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00138>
- Nara, K. (2006). Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *The New phytologist*, 169(1), 169-178.  
<https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01545.X>
- Narváez-Reinaldo, J. J., Barba, I., González-López, J., Tunnacliffe, A., & Manzanera, M. (2010). Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5254-5262.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00855-10>

- NASA Earth Observatory. (2023). *Spain browned by drought*. The Earth Observatory; NASA Earth Observatory. <https://earthobservatory.nasa.gov/images/151366/spain-browned-by-drought>
- Nessel, M. P., Konnovitch, T., Romero, G. Q., & Gonz Alez, A. L. (2021). Nitrogen and phosphorus enrichment cause declines in invertebrate populations: A global meta-analysis. *Biological Reviews*, 96(6), 2617-2637. <https://doi.org/10.1111/brv.12771>
- Neu, A. T., Allen, E. E., & Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(51), e2104429118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
- Nicoletti, R., Di Vaio, C., & Cirillo, C. (2020). Endophytic Fungi of Olive Tree. *Microorganisms*, 8(9), 1321. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091321>
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1022>
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H. P., Goodfellow, M., & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 355158. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02007>
- Nouioui, I., Ha, S. min, Baek, I., Chun, J., & Goodfellow, M. (2022). Genome insights into the pharmaceutical and plant growth promoting features of the novel species

- Nocardia alni sp. Nov. *BMC Genomics*, 23(1), 1-13.  
<https://doi.org/10.1186/S12864-021-08257-Y>
- Nouri, E., Surve, R., Bapaume, L., Stumpe, M., Chen, M., Zhang, Y., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H., Glauser, G., Bruissson, S., & Reinhardt, D. (2021). Phosphate suppression of arbuscular mycorrhizal symbiosis involves gibberellic acid signaling. *Plant and Cell Physiology*, 62(6), 959-970.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcab063>
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *The Science of the total environment*, 743, 140682.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140682>
- Olesen, J. M., Bascompte, J., Dupont, Y. L., & Jordano, P. (2006). The smallest of all worlds: Pollination networks. *Journal of Theoretical Biology*, 240(2), 270-276.  
<https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2005.09.014>
- Olivares, J., Casadesus, J., & Bedmar, E. J. (1980). Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti strains. *Applied and environmental microbiology*, 39(5), 967-970. <https://doi.org/10.1128/AEM.39.5.967-970.1980>
- O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology*, 2(5), 1-6.  
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
- Overmann, J. (2006). Principles of enrichment, isolation, cultivation and preservation of prokaryotes. *The Prokaryotes*, 80-136. [https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9_5)

- Özkurt, E., Fritscher, J., Soranzo, N., Ng, D. Y. K., Davey, R. P., Bahram, M., & Hildebrand, F. (2022). LotuS2: An ultrafast and highly accurate tool for amplicon sequencing analysis. *Microbiome*, *10*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01365-1>
- Paliy, O., & Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular ecology*, *25*(5), 1032. <https://doi.org/10.1111/MEC.13536>
- Palla, M., Turrini, A., Cristani, C., Caruso, G., Avio, L., Giovannetti, M., & Agnolucci, M. (2020). Native mycorrhizal communities of olive tree roots as affected by protective green cover and soil tillage. *Applied Soil Ecology*, *149*, 103520. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2020.103520>
- Parween, T., Jan, S., Mahmooduzzafar, S., Fatma, T., & Siddiqui, Z. H. (2016). Selective effect of pesticides on plant—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(1), 160-179. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.787969>
- Pascazio, S., Crecchio, C., Ricciuti, P., Palese, A. M., Xiloyannis, C., & Sofo, A. (2015). Phyllosphere and carposphere bacterial communities in olive plants subjected to different cultural practices. *International Journal of Plant Biology*, *6*(1), 15-19. <https://doi.org/10.4081/pb.2015.6011>
- Patumi, M., D'Andria, R., Marsilio, V., Fontanazza, G., Morelli, G., & Lanza, B. (2002). Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*, *77*(1), 27-34. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00317-X)
- Paula, F. S., Rodrigues, J. L. M., Zhou, J., Wu, L., Mueller, R. C., Mirza, B. S., Bohannan, B. J. M., Nüsslein, K., Deng, Y., Tiedje, J. M., & Pellizari, V. H. (2014). Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest

- soil microbial communities. *Molecular Ecology*, 23(12), 2988-2999.  
<https://doi.org/10.1111/mec.12786>
- Pekcan, A., Turan, T., & Sevim Çolakoğlu, H. (2009). Effects of organomineral, mineral and farmyard manures on the yield and quality of olive trees. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(10), 1152-1155.
- Perdomo-González, A., Pérez-Reverón, R., Goberna, M., León-Barrios, M., Fernández-López, M., Villadas, P. J., Reyes-Betancort, J. A., & Díaz-Peña, F. J. (2023). How harmful are exotic plantations for soils and its microbiome? A case study in an arid island. *Science of The Total Environment*, 879, 163030.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.163030>
- Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Segura, F., & Lopez-Miranda, J. (2007). The influence of olive oil on human health: Not a question of fat alone. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(10), 1199-1208.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200600273>
- Pérez-López, D., Ribas, F., Moriana, A., Rapoport, H. F., & De Juan, A. (2008). Influence of temperature on the growth and development of olive (*Olea europaea* L.) trees. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(2), 171-176.  
<https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512366>
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13(C), 131-144.  
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: Beneficial influences of plant growth-promoting

- rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 403-415. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-0996-1>
- Piñeiro, V., Arias, J., Dürr, J., Elverdin, P., Ibáñez, A. M., Kinengyere, A., Opazo, C. M., Owoo, N., Page, J. R., Prager, S. D., & Torero, M. (2020). A scoping review on incentives for adoption of sustainable agricultural practices and their outcomes. *Nature*, 3(10), 809-820. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00617-y>
- Plassart, P., Prévost-Bouré, N. C., Uroz, S., Dequiedt, S., Stone, D., Creamer, R., Griffiths, R. I., Bailey, M. J., Ranjard, L., & Lemanceau, P. (2019). Soil parameters, land use, and geographical distance drive soil bacterial communities along a European transect. *Scientific Reports*, 9(1), 605. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36867-2>
- Podolich, O., Ardanov, P., Zaets, I., Pirttilä, A. M., & Kozyrovskaya, N. (2015). Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant and Soil*, 388(1-2), 367-377. <https://doi.org/10.1007/S11104-014-2235-1>
- Põlme, S., Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Lindahl, B. D., Clemmensen, K. E., Kauserud, H., Nguyen, N., Kjølter, R., Bates, S. T., Baldrian, P., Frøslev, T. G., Adojaan, K., Vizzini, A., Suija, A., Pfister, D., Baral, H. O., Järv, H., Madrid, H., Nordén, J., ... Tedersoo, L. (2020). FungalTraits: A user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal Diversity*, 105(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/S13225-020-00466-2>
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2017). Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates

- to be used as biocontrol agents. *Biological Control*, 110, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.011>
- Prieto, P., Navarro-Raya, C., Valverde-Corredor, A., Amyotte, S. G., Dobinson, K. F., & Mercado-Blanco, J. (2009). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microbial biotechnology*, 2(4), 499-511.  
<https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2009.00105.X>
- 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), e0227434.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227434>
- Pulido, F. J., Díaz, M., & Hidalgo De Trucios, S. J. (2001). Size structure and regeneration of Spanish holm oak *Quercus ilex* forests and dehesas: Effects of agroforestry use on their long-term sustainability. *Forest Ecology and Management*, 146(1-3), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00443-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00443-6)
- Qi, R., Li, J., Lin, Z., Li, Z., Li, Y., Yang, X., Zhang, J., & Zhao, B. (2016). Temperature effects on soil organic carbon, soil labile organic carbon fractions, and soil enzyme activities under long-term fertilization regimes. *Applied Soil Ecology*, 102, 36-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.004>
- Qiao, C., Penton, C. R., Xiong, W., Liu, C., Wang, R., Liu, Z., Xu, X., Li, R., & Shen, Q. (2019). Reshaping the rhizosphere microbiome by bio-organic amendment to enhance crop yield in a maize-cabbage rotation system. *Applied Soil Ecology*, 142, 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.04.014>

- Qu, Z., Zhao, H., Zhang, H., Wang, Q., Yao, Y., Cheng, J., Lin, Y., Xie, J., Fu, Y., & Jiang, D. (2020). Bio-priming with a hypovirulent phytopathogenic fungus enhances the connection and strength of microbial interaction network in rapeseed. *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00157-5>
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50, 403-424. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-081211-172908>
- Rallo, L., Barranco, D., Díez, C. M., Rallo, P., Suárez, M. P., Trapero, C., & Alfaro, F. P. (2018). Strategies for olive (*Olea europaea* L.) breeding: Cultivated genetic resources and crossbreeding. En *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (Vol. 3, pp. 555-600). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_14)
- Ramírez-Tejero, J. A., Jiménez-Ruiz, J., Serrano, A., Belaj, A., León, L., de la Rosa, R., Mercado-Blanco, J., & Luque, F. (2021). Verticillium wilt resistant and susceptible olive cultivars express a very different basal set of genes in roots. *BMC Genomics*, 22(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07545-x>
- Răut, I., Călin, M., Capră, L., Gurban, A. M., Doni, M., Radu, N., & Jecu, L. (2021). Cladosporium sp. Isolate as fungal Plant Growth Promoting Agent. *Agronomy*, 11(2), 392. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11020392>

- Ravanbakhsh, M., Kowalchuk, G. A., & Jousset, A. (2019). Root-associated microorganisms reprogram plant life history along the growth-stress resistance tradeoff. *The ISME journal*, *13*(12), 3093-3101. <https://doi.org/10.1038/S41396-019-0501-1>
- Reay, D. S., Davidson, E. A., Smith, K. A., Smith, P., Melillo, J. M., Dentener, F., & Crutzen, P. J. (2012). Global agriculture and nitrous oxide emissions. *Nature Climate Change*, *2*(6), 410-416. <https://doi.org/10.1038/nclimate1458>
- Reel, P. S., Reel, S., Pearson, E., Trucco, E., & Jefferson, E. (2021). Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review. *Biotechnology Advances*, *49*, 107739. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107739>
- Reigel, A. M., & Hellberg, M. E. (2023). Microbiome environmental shifts differ between two co-occurring octocoral hosts. *Marine Ecology Progress Series*, *720*, 59-83. <https://doi.org/10.3354/MEPS14401>
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: Bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(4), 435-443. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>
- Rey, P. J. (2011). Preserving frugivorous birds in agro-ecosystems: Lessons from Spanish olive orchards. *Journal of Applied Ecology*, *48*(1), 228-237. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2664.2010.01902.X>
- Robinson MD, McCarthy DJ, S. G. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*, 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodríguez, C. E., Antonielli, L., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2020). Heritability and functional importance of the setaria viridis bacterial seed microbiome.

- Phytobiomes Journal*, 4(1), 40-52. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-04-19-0023-R>
- Rodríguez Sousa, A. A., Muñoz-Rojas, J., Brígido, C., & Prats, S. A. (2023). Impacts of agricultural intensification on soil erosion and sustainability of olive groves in Alentejo (Portugal). *Landscape Ecology*, 3, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10980-023-01682-2>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10), e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Romdhane, S., Spor, A., Banerjee, S., Breuil, M. C., Bru, D., Chabbi, A., Hallin, S., van der Heijden, M. G. A., Saghai, A., & Philippot, L. (2022). Land-use intensification differentially affects bacterial, fungal and protist communities and decreases microbiome network complexity. *Environmental Microbiomes*, 17(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/S40793-021-00396-9/>
- Romero-Gámez, M., Castro-Rodríguez, J., & Suárez-Rey, E. M. (2017). Optimization of olive growing practices in Spain from a life cycle assessment perspective. *Journal of Cleaner Production*, 149, 25-37. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2017.02.071>
- Rosati, A., Zipančič, M., Caporali, S., & Paoletti, A. (2010). Fruit set is inversely related to flower and fruit weight in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 126(2), 200-204. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2010.07.010>
- Rossi, L., Francini, A., Minnocci, A., & Sebastiani, L. (2015). Salt stress modifies apoplastic barriers in olive (*Olea europaea* L.): A comparison between a salt-tolerant and a

- salt-sensitive cultivar. *Scientia Horticulturae*, 192, 38-46.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2015.05.023>
- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R*.  
<http://www.rstudio.com/>
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514-525.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Sáez-Nieto, J. A., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernandez-Torres, M. A., Villalón, P., & Valdezate, S. (2017). *Paenibacillus* spp. Isolated from human and environmental samples in Spain: Detection of 11 new species. *New Microbes and New Infections*, 19, 19-27. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2017.05.006>
- Sánchez-López, A. S., Pintelon, I., Stevens, V., Imperato, V., Timmermans, J. P., González-Chávez, C., Carrillo-González, R., Van hamme, J., Vangronsveld, J., & Thijs, S. (2018). Seed endophyte microbiome of *Crotalaria pumila* unpeeled: Identification of plant-beneficial Methylobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 291. <https://doi.org/10.3390/IJMS19010291>
- Sasada, R., Weinstein, M., Prem, A., Jin, M., & Bhasin, J. (2020). FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. *Journal of Biomolecular Techniques*, 31(Suppl), S2.
- Sastre, B., Barbero-Sierra, C., Bienes, R., Marques, M. J., & García-Díaz, A. (2017). Soil loss in an olive grove in Central Spain under cover crops and tillage treatments, and farmer perceptions. *Journal of Soils and Sediments*, 17(3), 873-888.  
<https://doi.org/10.1007/s11368-016-1589-9>

- Saunders, C. W., Scheynius, A., & Heitman, J. (2012). Malassezia fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. *PLoS Pathogens*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002701>
- Schloss, P. D., & Mcbain, A. J. (2020). Reintroducing mothur: 10 Years Later. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(2), e02343-19. <https://doi.org/10.1128/AEM>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmidt, J. E., Kent, A. D., Brisson, V. L., & Gaudin, A. C. M. (2019). Agricultural management and plant selection interactively affect rhizosphere microbial community structure and nitrogen cycling. *Microbiome*, *7*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0756-9>
- Seipke, R. F., Kaltenpoth, M., & Hutchings, M. I. (2012). Streptomyces as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(4), 862-876. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00313.X>
- Semenov, M. V., Krasnov, G. S., Semenov, V. M., & van Bruggen, A. (2022). Mineral and organic Fertilizers distinctly affect fungal communities in the crop rhizosphere. *Journal of Fungi*, *8*(3), 251. <https://doi.org/10.3390/jof8030251>
- Serrano, A., Rodríguez-Jurado, D., Ramírez-Tejero, J. A., Luque, F., López-Escudero, F. J., Belaj, A., Román, B., & León, L. (2023). Response to *Verticillium dahliae* infection

- in a genetically diverse set of olive cultivars. *Scientia Horticulturae*, 316, 112008.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2023.112008>
- Serrano-Notivoli, R., Tejedor, E., Sarricolea, P., Meseguer-Ruiz, O., de Luis, M., Saz, M. Á., Longares, L. A., & Olcina, J. (2023). Unprecedented warmth: A look at Spain's exceptional summer of 2022. *Atmospheric Research*, 293, 106931.  
<https://doi.org/10.1016/J.ATMOSRES.2023.106931>
- Servicio de Estudios y Estadísticas. (2019). *Análisis de la densidad en las plantaciones de olivar en Andalucía*.
- Shade, A., Jacques, M. A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current opinion in microbiology*, 37, 15-22. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.03.010>
- Shannon, C. E. (1948). The mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/GR.1239303>
- Sharaf, H., Thompson, A. A., Williams, M. A., & Peck, G. M. (2021). Compost applications increase bacterial community diversity in the apple rhizosphere. *Soil Science Society of America Journal*, 85(4), 1105-1121.  
<https://doi.org/10.1002/saj2.20251>
- Shi, W., Zhao, H. Y., Chen, Y., Wang, J. S., Han, B., Li, C. P., Lu, J. Y., & Zhang, L. M. (2021). Organic manure rather than phosphorus fertilization primarily determined asymbiotic nitrogen fixation rate and the stability of diazotrophic community in

- an upland red soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 319, 107535.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107535>
- Shiu, J. H., Ding, J. Y., Tseng, C. H., Lou, S. P., Mezaki, T., Wu, Y. T., Wang, H. I., & Tang, S. L. (2018). A Newly Designed Primer Revealed high phylogenetic diversity of endozoicomonas in coral reefs. *Microbes and Environments*, 33(2), 172.  
<https://doi.org/10.1264/JSME2.ME18054>
- Shiva, S., Vurukonda, K. P., Mandrioli, M., Apice, G. D. ', & Stefani, E. (2020). Draft genome sequence of plant growth-promoting *Streptomyces* sp. Strain SA51, isolated from olive trees. *Microbiology Resource Announcements*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1128/MRA.00768-19>
- Sietz, D., Klimek, S., & Dauber, J. (2022). Tailored pathways toward revived farmland biodiversity can inspire agroecological action and policy to transform agriculture. *Communications Earth & Environment*, 3(1), 1-9.  
<https://doi.org/10.1038/s43247-022-00527-1>
- Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rochefort, A., Marais, C., Sarniguet, A., & Barret, M. (2022). Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *New Phytologist*, 234(4), 1448-1463.  
<https://doi.org/10.1111/nph.18037>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148), 688-688.  
<https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singh, B. K., Trivedi, P., Egidi, E., Macdonald, C. A., & Delgado-Baquerizo, M. (2020). Crop microbiome and sustainable agriculture. *Nature Reviews*, 18(11), 601-602.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00446-y>

- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *140*(3-4), 339-353. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2011.01.017>
- Smith, D. R. (2013). The battle for user-friendly bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, *4*(SEP). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2013.00187>
- Smith, D. R. (2015). Buying in to bioinformatics: An introduction to commercial sequence analysis software. *Briefings in Bioinformatics*, *16*(4), 700-709. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBU030>
- Sofo, A., Ciarfaglia, A., Scopa, A., Camele, I., Curci, M., Crecchio, C., Xiloyannis, C., & Palese, A. M. (2014). Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use and Management*, *30*(1), 160-167. <https://doi.org/10.1111/SUM.12097>
- Sofo, A., Manfreda, S., Fiorentino, M., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (2008). The olive tree: A paradigm for drought tolerance in Mediterranean climates. *Hydrol. Earth Syst. Sci*, *12*, 293-301.
- Sofo, A., Ricciuti, P., Fausto, C., Mininni, A. N., Crecchio, C., Scagliola, M., Malerba, A. D., Xiloyannis, C., & Dichio, B. (2019). The metabolic and genetic diversity of soil bacterial communities depends on the soil management system and C/N dynamics: The case of sustainable and conventional olive groves. *Applied Soil Ecology*, *137*, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.12.022>
- Sørensen, S. R., Ronen, Z., & Aamand, J. (2001). Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. Able to mineralize the phenylurea

- herbicide isoproturon. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5403-5409. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5403-5409.2001>
- Sousa, J. A. de J., & Olivares, F. L. (2016). Plant growth promotion by streptomycetes: Ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/S40538-016-0073-5>
- Stehle, S., & Schulz, R. (2015). Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5750-5755. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500232112>
- Stokstad, E. (2021). *Pesticides can harm bees twice—As larvae and adults*. <https://www.science.org/content/article/pesticides-can-harm-bees-twice-larvae-and-adults>
- Strang, A., Haynes, O., Cahill, N. D., & Narayan, D. A. (2018). Generalized relationships between characteristic path length, efficiency, clustering coefficients, and density. *Social Network Analysis and Mining*, 8(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s13278-018-0492-3>
- Straub, D., Blackwell, N., Langarica-Fuentes, A., Peltzer, A., Nahnsen, S., & Kleindienst, S. (2020). Interpretations of environmental microbial community studies are biased by the selected 16S rRNA (gene) amplicon sequencing pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 11, 550420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.550420>
- Suding, K. N., Collins, S. L., Gough, L., Clark, C., Cleland, E. E., Gross, K. L., Milchunas, D. G., & Pennings, S. (2005). Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 102(12), 4387-4392.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0408648102>
- Sun, J., Zhang, Q., Zhou, J., & Wei, Q. (2014). Pyrosequencing technology reveals the impact of different manure doses on the bacterial community in apple rhizosphere soil. *Applied Soil Ecology*, 78, 28-36.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.004>
- Sun, R., Dsouza, M., Gilbert, J. A., Guo, X., Wang, D., Guo, Z., Ni, Y., & Chu, H. (2016). Fungal community composition in soils subjected to long-term chemical fertilization is most influenced by the type of organic matter. *Environmental Microbiology*, 18(12), 5137-5150. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13512>
- Taffner, J., Bergna, A., Cernava, T., & Berg, G. (2020). Tomato-associated Archaea show a cultivar-specific rhizosphere effect but an unspecific transmission by seeds. *Phytobiomes Journal*, 4(2), 133-141. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-20-0017-R>
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 9(8), e105592.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
- Tan, J., Ben-Gal, A., Shtein, I., Bustan, A., Dag, A., & Erel, R. (2020). Root structural plasticity enhances salt tolerance in mature olives. *Environmental and Experimental Botany*, 179, 104224.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2020.104224>
- Tao, J., Meng, D., Qin, C., Liu, X., Liang, Y., Xiao, Y., Liu, Z., Gu, Y., Li, J., & Yin, H. (2018). Integrated network analysis reveals the importance of microbial interactions for

- maize growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3805-3818.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8837-4>
- Tejada, M., Gonzalez, J. L., García-Martínez, A. M., & Parrado, J. (2008). Application of a green manure and green manure composted with beet vinasse on soil restoration: Effects on soil properties. *Bioresource Technology*, 99(11), 4949-4957. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.026>
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannangara, S. D., & Promputtha, I. (2020). Fungi vs. Fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>
- The Metropolitan Museum of Art. (2023). *Floral collars from Tutankhamun's embalming cache*. <https://www.metmuseum.org/art/collection/search/544782>
- Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: An overview. *Critical reviews in microbiology*, 39(3), 256-294.  
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.709819>
- Trabelsi, L., Gargouri, K., Ayadi, M., Mbadra, C., Ben Nasr, M., Ben Mbarek, H., Ghrab, M., Ben Ahmed, G., Kammoun, Y., Loukil, E., Maktouf, S., Khlifi, M., & Gargouri, R. (2022). Impact of drought and salinity on olive potential yield, oil and fruit qualities (cv. Chemlali) in an arid climate. *Agricultural Water Management*, 269, 107726. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2022.107726>
- Trapero, C., Alcántara, E., Jiménez, J., Amaro-Ventura, M. C., Romero, J., Koopmann, B., Karlovsky, P., von Tiedemann, A., Pérez-Rodríguez, M., & López-Escudero, F. J. (2018). Starch hydrolysis and vessel occlusion related to wilt symptoms in olive

- stems of susceptible cultivars infected by *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00072>
- Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Anderson, I. C., & Singh, B. K. (2016). Response of soil properties and microbial communities to agriculture: Implications for primary productivity and soil health indicators. *Frontiers in Plant Science*, 7, 990. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00990>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607-621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Trujillo, M. E., Riesco, R., Benito, P., & Carro, L. (2015). Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1341. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01341>
- Tsamir-Rimon, M., Ben-Dor, S., Feldmesser, E., Oppenheimer-Shaanan, Y., David-Schwartz, R., Samach, A., & Klein, T. (2021). Rapid starch degradation in the wood of olive trees under heat and drought is permitted by three stress-specific beta amylases. *New Phytologist*, 229(3), 1398-1414. <https://doi.org/10.1111/NPH.16907>
- T.T. Kozlowski. (1992). Carbohydrate sources and sinks in woody plants. *The Botanical Review*, 58(2).
- Tuimala, J., & Kallio, A. (2013). R, Programming Language. *Encyclopedia of Systems Biology*, 1809-1811. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_619](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_619)
- Turgay, M., Bachmann, H. P., Irmeler, S., von Ah, U., Fröhlich, M. T. W., Falentin, H., Deutsch, S. M., Jan, G., & Thierry, A. (2022). Bacteria, beneficial: *Propionibacterium* spp. And *Acidipropionibacterium* spp. *Encyclopedia of Dairy*

- Sciences: Third edition*, 4, 34-45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23016-3>
- United Nations. (2020). *Climate change in the Mediterranean*. <https://www.unep.org/unepmap/resources/factsheets/climate-change>
- Urbanová, M., Šnajdr, J., & Baldrian, P. (2015). Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.011>
- Uroz, S., Oger, P., Tisserand, E., CéBron, A., Turpault, M. P., Bueé, M., De Boer, W., Leveau, J. H. J., & Frey-Klett, P. (2016). Specific impacts of beech and Norway spruce on the structure and diversity of the rhizosphere and soil microbial communities. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep27756>
- Uylaşer, V., & Yildiz, G. (2014). The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1092-1101. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.626874>
- Valverde, P., Barranco, D., López-Escudero, F. J., Díez, C. M., & Trapero, C. (2023). Efficiency of breeding olives for resistance to Verticillium wilt. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1149570. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1149570>
- Valvez, S., Maceiras, A., Santos, P., & Reis, P. N. B. (2021). Olive stones as filler for polymer-based composites: A review. *Materials*, 14(4), 845. <https://doi.org/10.3390/MA14040845>
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: New concepts for natural product discovery.

- Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392-416. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX005>
- Vanwalleghem, T., Amate, J. I., de Molina, M. G., Fernández, D. S., & Gómez, J. A. (2011). Quantifying the effect of historical soil management on soil erosion rates in Mediterranean olive orchards. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142(3-4), 341-351. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2011.06.003>
- Vargas-Albores, F., Ortiz-Suárez, L. E., Villalpando-Canchola, E., & Martínez-Porchas, M. (2017). Size-variable zone in V3 region of 16S rRNA. *RNA Biology*, 14(11), 1514. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1317912>
- Vasconcelos, S., Pina, S., Herrera, J. M., Silva, B., Sousa, P., Porto, M., Melguizo-Ruiz, N., Jiménez-Navarro, G., Ferreira, S., Moreira, F., Heleno, R., Jonsson, M., & Beja, P. (2022). Canopy arthropod declines along a gradient of olive farming intensification. *Scientific Reports*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21480-1>
- Vergine, M., Meyer, J. B., Cardinale, M., Sabella, E., Hartmann, M., Cherubini, P., De Bellis, L., & Luvisi, A. (2019). The *Xylella fastidiosa*-resistant olive cultivar «Leccino» has stable endophytic microbiota during the Olive Quick Decline

- Syndrome (OQDS). *Pathogens*, 9(1).  
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9010035>
- Větrovský, T., Baldrian, P., & Morais, D. (2018). SEED 2: A user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, 34(13), 2292-2294. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY071>
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., & Goormachtig, S. (2016). Streptomyces as a plant's best friend? *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), 119. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIW119>
- Vicente-Vicente, J. L., Gómez-Muñoz, B., Hinojosa-Centeno, M. B., Smith, P., & Garcia-Ruiz, R. (2017). Carbon saturation and assessment of soil organic carbon fractions in Mediterranean rainfed olive orchards under plant cover management. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 245, 135-146. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2017.05.020>
- Vida, C., Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2020). The role of organic amendments to soil for crop protection: Induction of suppression of soilborne pathogens. *Annals of Applied Biology*, 176(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/aab.12555>
- Vita, F., Sabbatini, L., Sillo, F., Ghignone, S., Vergine, M., Guidi Nissim, W., Fortunato, S., Salzano, A. M., Scaloni, A., Luvisi, A., Balestrini, R., De Bellis, L., & Mancuso, S. (2022). Salt stress in olive tree shapes resident endophytic microbiota. *Frontiers in Plant Science*, 13, 992395. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.992395>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2019). Root exudates: From plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3-17. <https://doi.org/10.1007/S00299-019-02447-5>

- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. As endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 952. <https://doi.org/10.3390/IJMS19040952>
- Wagg, C., Schlaeppli, K., Banerjee, S., Kuramae, E. E., & van der Heijden, M. G. A. (2019). Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. *Nature Communications*, *10*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12798-y>
- Wagner H. (2018). *Vegan: Community ecology package. R package version 2.5.2-5* [Software]. <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Del Rio, T. G., Tringe, S. G., Dangl, J. L., & Mitchell-Olds, T. (2016). Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications*, *7*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/ncomms12151>
- Walitang, D. I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y. K., Kang, Y., & Sa, T. (2017). Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>
- Wang, G., Chen, J., & Zhu, Y. (2022). Distinct bacterial community compositions in the *Populus* rhizosphere under three types of organic matter input across different soil types. *Plant and Soil*, *470*(1-2), 51-63. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04859-3>
- Wang, P., Wang, X., Nie, J., Wang, Y., Zang, H., Peixoto, L., Yang, Y., & Zeng, Z. (2022). Manure application increases soil bacterial and fungal network complexity and

- alters keystone taxa. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(1), 607-618.  
<https://doi.org/10.1007/s42729-021-00673-z>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, X., Radwan, M. M., Taráwneh, A. H., Gao, J., Wedge, D. E., Rosa, L. H., Cutler, H. G., & Cutler, S. J. (2013). Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 4551-4555.  
<https://doi.org/10.1021/jf400212y>
- Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., & Qian, P. Y. (2014). Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. *PLOS ONE*, 9(3), e90053.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090053>
- Wassermann, B., Adam, E., Cernava, T., & Berg, G. (2019). Understanding the indigenous seed microbiota to design bacterial seed treatments. En *Seed Endophytes: Biology and Biotechnology* (pp. 83-99). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_5)
- Wassermann, B., Cernava, T., Müller, H., Berg, C., & Berg, G. (2019). Seeds of native alpine plants host unique microbial communities embedded in cross-kingdom networks. *Microbiome*, 7(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0723-5>

- Wassermann, B., Müller, H., & Berg, G. (2019). An apple a day: Which bacteria do we eat with organic and conventional apples? *Frontiers in Microbiology*, *10*, 475179. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01629>
- Wassermann, B., Rybakova, D., Adam, E., Zachow, C., Bernhard, M., Müller, M., Mancinelli, R., & Berg, G. (2021). Studying seed microbiomes. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2232, pp. 1-21). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1040-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1040-4_1)
- Weber, C. F., Vilgalys, R., & Kuske, C. R. (2013). Changes in fungal community composition in response to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization varies with soil horizon. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 78. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00078>
- 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), 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Wentzien, N. M., Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2023). Thriving beneath olive trees: The influence of organic farming on microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *21*, 3575-3589. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2023.07.015>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press, Inc.

Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer New York.

<https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>

Wickham, H. (2020). *Advanced R*. Chapman and Hall.

Wickham, H. (2021). *Mastering Shiny: Build interactive apps, reports, and dashboards*

*powered by R*. <https://www.oreilly.com/library/view/mastering-shiny/9781492047377/>

Wickham, H., Çetinkaya-Rundel, M., & Grolemund, G. (2023). *R for Data Science*.

<https://r4ds.hadley.nz/>

Windisch, S., Sommermann, L., Babin, D., Chowdhury, S. P., Grosch, R., Moradtalab, N.,

Walker, F., Höglinger, B., El-Hasan, A., Armbruster, W., Nesme, J., Sørensen, S. J.,

Schellenberg, I., Geistlinger, J., Smalla, K., Rothballer, M., Ludewig, U., &

Neumann, G. (2021). Impact of long-term organic and mineral fertilization on

rhizosphere metabolites, root–microbial interactions and plant health of lettuce.

*Frontiers in Microbiology*, *11*, 3157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.597745>

Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Izak, D., Szafranek-Nakonieczna, A., Banach,

A., & Błaszczak, M. (2017). Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of

agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Applied Soil*

*Ecology*, *119*, 128-137. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.009>

Wu, M., Guo, X., Wu, J., & Chen, K. (2020). Effect of compost amendment and

bioaugmentation on PAH degradation and microbial community shifting in

petroleum-contaminated soil. *Chemosphere*, *256*.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126998>

- Wu, M., Wu, J., & Gan, Y. (2020). The new insight of auxin functions: Transition from seed dormancy to germination and floral opening in plants. *Plant Growth Regulation*, *91*(2), 169-174. <https://doi.org/10.1007/S10725-020-00608-1>
- Wu, T., Chellemi, D. O., Graham, J. H., Martin, K. J., & Roskopf, E. N. (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>
- Wu, X., Hu, H., Li, S., Zhao, J., Li, J., Zhang, G., Li, G., & Xiu, W. (2022). Chemical fertilizer reduction with organic material amendments alters co-occurrence network patterns of bacterium-fungus-nematode communities under the wheat–maize rotation regime. *Plant and Soil*, *473*(1-2), 605-623. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05314-7>
- Xiao, N., Zhou, A., Kempfer, M. L., Zhou, B. Y., Shi, Z. J., Yuan, M., Guo, X., Wu, L., Ning, D., van Nostrand, J., Firestone, M. K., & Zhou, J. (2022). Disentangling direct from indirect relationships in association networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.2109995119>
- Xie, Y., Allaire, J. J., & Grolemond, G. (2019). *R Markdown: The definitive guide*. CRC Press. <https://www.routledge.com/R-Markdown-The-Definitive-Guide/Xie-Allaire-Grolemond/p/book/9781138359338>
- Xu, T.-C., Lu, Y.-H., Wang, J.-F., Song, Z.-Q., Hou, Y.-G., Liu, S.-S., Liu, C.-S., & Wu, S.-H. (2021). Bioactive secondary metabolites of the genus *Diaporthe* and anamorph phomopsis from terrestrial and marine habitats and endophytes: 2010–2019. *Microorganisms*, *9*(2), 217. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020217>

- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, *13*(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206428>
- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., & Ye, B. (2017). Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS ONE*, *12*(5), e0178425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178425>
- Ye, G., Banerjee, S., He, J. Z., Fan, J., Wang, Z., Wei, X., Hu, H. W., Zheng, Y., Duan, C., Wan, S., Chen, J., & Lin, Y. (2021). Manure application increases microbiome complexity in soil aggregate fractions: Results of an 18-year field experiment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *307*, 107249. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107249>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, *13*(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001755>
- Yu, Z., Lu, T., & Qian, H. (2023). Pesticide interference and additional effects on plant microbiomes. *Science of The Total Environment*, *888*, 164149. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.164149>

- Zafra, A., M'rani-Alaoui, M., Lima, E., Jimenez-Lopez, J. C., & Alché, J. de D. (2018). Histological features of the olive seed and presence of 7S-Type seed storage proteins as hallmarks of the olive fruit development. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 414449. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01481>
- Zeng, Y., Nupur, Y., Wu, N., Madsen, A. M., Chen, X., Gardiner, A. T., & Koblížek, M. (2021). *Gemmatimonas groenlandica* sp. Nov. Is an aerobic anoxygenic phototroph in the phylum Gemmatimonadetes. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 606612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.606612>
- Zeng, Y., Selyanin, V., Lukeš, M., Dean, J., Kaftan, D., Feng, F., & Koblížek, M. (2015). Characterization of the microaerophilic, bacteriochlorophyll a-containing bacterium *Gemmatimonas phototrophica* sp. Nov., and emended descriptions of the genus *Gemmatimonas* and *Gemmatimonas aurantiaca*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *65*(8), 2410-2419. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.000272>
- Zhang, H., Duan, Y., Cai, F., Cao, D., Wang, L., Qiao, Z., Hong, Q., Li, N., Zheng, Y., Su, M., Liu, Z., & Zhu, B. (2022). Next-Generation Probiotics: Microflora intervention to human diseases. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5633403>
- Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., & Nakamura, K. (2003). *Gemmatimonas aurantiaca* gen. Nov., sp. Nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. Nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(4), 1155-1163. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.02520-0>

- Zhang, J. J., & Yang, H. (2021). Metabolism and detoxification of pesticides in plants. *Science of The Total Environment*, 790, 148034. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148034>
- Zhang, Q. C., Shamsi, I. H., Xu, D. T., Wang, G. H., Lin, X. Y., Jilani, G., Hussain, N., & Chaudhry, A. N. (2012). Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, 57, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.012>
- Zhang, S., Sun, L., Wang, Y., Fan, K., Xu, Q., Li, Y., Ma, Q., Wang, J., Ren, W., & Ding, Z. (2020). Cow manure application effectively regulates the soil bacterial community in tea plantation. *BMC Microbiology*, 20(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01871-y>
- Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., & Shen, Y. (2015). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 528(7580), 51-59. <https://doi.org/10.1038/nature15743>
- Zhao, J. J., Zhang, J., Sun, L., Zhang, R. J., Zhang, C. W., Yin, H. Q., & Zhang, X. X. (2017). *Rhizobium oryzae* sp. Nov., isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(4), 963-968. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001724>
- Zhao, R., Liu, J., Xu, N., He, T., Meng, J., & Liu, Z. (2022). Urea hydrolysis in different farmland soils as affected by long-term biochar application. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 1304. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.950482>
- Zhou, J., Jiang, X., Zhou, B., Zhao, B., Ma, M., Guan, D., Li, J., Chen, S., Cao, F., Shen, D., & Qin, J. (2016). Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast

## BIBLIOGRAFÍA

---

- China. *Soil Biology and Biochemistry*, 95, 135-143.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.12.012>
- Zhou, Y., Liu, M., & Yang, J. (2022). Recovering metagenome-assembled genomes from shotgun metagenomic sequencing data: Methods, applications, challenges, and opportunities. *Microbiological research*, 260.  
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127023>
- Zipori, I., Erel, R., Yermiyahu, U., Ben-gal, A., & Dag, A. (2020). Sustainable management of olive orchard nutrition: A review. *Agriculture (Switzerland)*, 10(1), 11.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture10010011>
- Zohary, D., & Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187(4174), 319-327. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.187.4174.319>