

**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Vicerrectoría de Investigación y Extensión  
Dirección de Proyectos**

**Informe final de proyecto de investigación**

**Análisis de comunidades biológicas en suelos de plantaciones de  
piña en la Región Huetar Norte, como opción para controles  
alternativos de patologías**

**DOCUMENTO 1**

**Tomás de Jesús Guzmán Hernández, investigador coordinador**

Febrero, 2022

## Tabla de Contenido

1	Datos generales .....	3
2	Resumen .....	4
3	Introducción .....	5
4	Marco Teórico .....	6
5	Materiales y Metodos .....	8
6	Resultados .....	11
7	Discusión y conclusiones .....	23
8	Recomendaciones .....	25
9	Referencias .....	25

## **1 Datos generales**

**Código del Proyecto:** CF 1320067

**Nombre del proyecto:** Análisis de comunidades biológicas en suelos de plantaciones de piña en la Región Huetar Norte, como opción para controles alternativos de patologías.

**Departamento académico responsable:** Área académica del DOCINADE

**Otras escuelas participantes:** Escuela de Agronomía

Escuela de Ciencias Naturales y Exactas.

**Instituciones participantes externas al ITCR:** colaboró el Dr. Reyes Peña Santiago de la Universidad de Jaén, España.

**Investigador coordinador:** Tomás de Jesús Guzmán Hernández, Dr.

**Investigadores colaboradores\*:**

Dra. Ingrid Varela Benavides.

Fabián Echeverría Beirute, PhD.

Zulay Castro Jiménez, MBA

José Pablo Jiménez Madrigal, PhD.

**Período de ejecución:** enero 2019- junio 2021 (incluyendo ampliación).

## 2 Resumen

El desconocimiento de las comunidades biológicas que habitan los suelos, especialmente las de los suelos tropicales, es una limitante para gestionar y aprovechar los servicios ecológicos que éstas brindan a los agroecosistemas. En esta investigación se logró contribuir al conocimiento de las comunidades biológicas de los suelos en plantaciones piñeras en la Región Huetar Norte de Costa Rica. Se obtuvieron muestras de 15 plantaciones de piña y 11 parches de bosques o plantaciones de árboles cerca de ellos. En primera instancia, se logró obtener un protocolo de extracción de ADN ambiental a partir de muestras de suelo cultivado y no cultivado de las principales regiones piñeras del país, base para cualquier estudio metagenómico. El protocolo demostró ser adecuado para posteriores procesos de secuenciación de ADN. Los análisis bioinformáticos de la riqueza de especies en el microbioma del suelo, logró demostrar que existen pequeños cambios en la estructura de las comunidades, sin embargo, existen algunas poblaciones que fluctúan según el uso del suelo. Paralelamente, se demostró que la diversidad biológica de nematodos está relacionada con la calidad del suelo, al menos a nivel de género. *Helicotylenchus* fue el género más abundante en piña, mientras que *Discocriconemella* dominó en bosques y plantaciones de árboles. Toda la información analizada demuestra que el uso del suelo genera cambios en su estructura y composición, lo cual genera variaciones también en la presencia de nematodos, hongos y bacterias. El impacto y uso de dicha información, permitiría a futuro generar estudios más específicos, que permitan esclarecer cuáles comunidades biológicas podrían ser más susceptibles a cambios, ser beneficiosas o incluso tener algún efecto negativo al cultivo.

**Palabras clave:** metagenómica, microbioma, nematodos, 16S, ITS, piña.

### 3 Introducción

Aunque es conocido que la biota edáfica, especialmente la asociada a la rizosfera tiene un papel fundamental en la regulación de las poblaciones de patógenos, y en el estímulo de la inmunidad de la planta, todavía en la agricultura tal diversidad es omitida al establecer las prácticas de manejo agrícolas. Por tal razón es que se justifica realizar estudios en nuestros suelos, para entenderlos y mejorarlos. La información sobre la biodiversidad del suelo permitirá establecer parámetros para evaluar de mejor forma su calidad, evaluar la efectividad de prácticas de manejo, su efecto en la sanidad del suelo, y estimular la supresividad de los mismos con la consecuente disminución del uso de plaguicidas (Rodríguez et al., 2011; Ferris y Tuomisoto, 2015; Fierer et al. 2015). Se ha descubierto, por ejemplo, que distintos genotipos de plantas, incluso entre la misma especie, pueden desarrollar comunidades biológicas distintas en la rizosfera (Micallef et al., 2009; Palomares-Rius et al., 2012), lo que sugiere que es importante estudiar y conocer la composición de las comunidades biológicas en los suelos y su interacción con los cultivos, para establecer las mejores prácticas de manejo.

A este respecto, Shen et al. (2017) determinaron que las comunidades bacterianas y fúngicas son alteradas significativamente después de largos periodos de monocultivo de banano, y que el cambio en las interacciones inter- e intraespecíficas entre bacterias y hongos en las redes tróficas y la materia orgánica, están asociadas con la enfermedad de *Fusarium*. Además, prácticas agrícolas comúnmente utilizadas en la actualidad podrían tener un efecto negativo en la composición de la biota edáfica con la consecuente disminución de los beneficios derivados de la misma (Liu et al., 2015). El conocimiento y la evaluación de tal diversidad es por ende fundamental para mejorar la aplicación de tales prácticas agrícolas.

Respecto al cultivo de piña, en Costa Rica, los beneficios económicos derivados de la producción de piña han sido opacados por los efectos negativos al ambiente que ocasiona esta actividad (Acuña-González, 2009). Actualmente en Costa Rica, el cultivo de piña es una de las actividades agrícolas más importantes y con más crecimiento. La Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP) estima un total de 43.000 hectáreas sembradas de piña y 32.000 empleos directos generados por la actividad. Además, la exportación de esta fruta produce importantes ingresos que en el año 2017 ascendieron a \$942 millones de dólares, encontrándose en la Región Huetar Norte la mayor cantidad de hectáreas sembradas de piña (CANAPEP, <https://canapep.com/estadisticas/>).

Junto con el crecimiento de esta actividad, también ha crecido la controversia por los posibles efectos ambientales y sociales derivados de la misma, entre éstos: la contaminación de aguas destinadas al consumo humano, la contaminación en ríos, la destrucción de bosques secundarios de manera indiscriminada, la presión a pobladores para que vendan sus propiedades, problemas en el aumento de plagas como moscas, malos olores, desvío de aguas

de ríos, aumento y proliferación de enfermedades respiratorias y de la piel, entre otras (Acuña-González, 2009).

La información que facilite un manejo más apropiado del cultivo de piña será muy valiosa para el sector, incluyendo el manejo del suelo, ya que en este cultivo la aplicación de agroquímicos es muy intensiva.

#### **4 Marco Teórico**

El desconocimiento de las comunidades biológicas de los suelos, especialmente las de los suelos tropicales, es una limitante para gestionar y aprovechar los servicios ecológicos que éstas brindan a los agroecosistemas. Un 25% de la diversidad global existente se encuentra en el suelo, constituyendo un recurso de gran valor cuya importancia fue por mucho tiempo subestimada, especialmente si se toma en cuenta que 95% de la alimentación mundial depende del suelo, y de que éste es el recurso base para la producción de fibras, combustibles y medicinas, entre otros (FAO, s.f.; Bertsch y Henríquez, 2015).

Esta realidad ha empezado a cambiar, los descubrimientos de los últimos años, referentes a la diversidad de especies habitantes del suelo, han permitido profundizar en los mecanismos involucrados en la regulación de los servicios del ecosistema que ofrecen las mismas, tales como: el ciclado de nutrientes (Van Der Heijden et al., 2008), la fijación de carbono (Looby et al., 2018) y la salud de la planta en general (Zamioudis, y Pieterse, 2012).

Los mecanismos a través de los cuales los microorganismos que habitan la rizosfera pueden afectar los patógenos del suelo ya han sido identificados e incluyen la producción de antibióticos, la regulación de metabolitos que estimulan los patógenos a través del consumo, la competencia por nutrientes, y la producción de enzimas líticas (Doornbos et al., 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Además, se ha determinado que la capacidad de supresión del suelo puede ser aumentada, por ejemplo, incrementando los recursos para los depredadores, y removiendo las limitaciones físicas y químicas para su crecimiento, también aplicando prácticas para favorecer el que presas y depredadores coincidan en tiempo y espacio (Steel y Ferris, 2016). El éxito de tales prácticas dependerá del conocimiento previo que se tenga sobre la biota del suelo.

Fue con la aplicación de herramientas moleculares al estudio de la biota edáfica que se logró analizar de forma más integral este ecosistema, en el que se estima pueden convivir 10.000 especies de organismos procariontes por gramo de suelo, muchos de los cuales no se han podido aislar ni cultivar. Por otro lado, los últimos hallazgos y la complejidad de los ecosistemas estudiados han originado nuevas preguntas, muchas de ellas relacionadas con las mejores estrategias para evaluar las hipótesis que relacionan la riqueza de especies y la composición de la comunidad con los descriptores del funcionamiento ecosistémico (Bowker

et al., 2010). Además, el uso de ecometagenómica para el estudio de los suelos, es todavía una herramienta en desarrollo, que debe mejorarse para potenciar la identificación y la evaluación de las poblaciones (Bisseling et al., 2009; Porazinska et al., 2014), y para poder aplicar la información obtenida en la optimización de los servicios ecosistémicos (Fierer et al. 2015; Ferris y Tuomisto, 2015).

Aunque la investigación tendiente a aumentar la comprensión de los ecosistemas edáficos utilizando metagenómica ha ido en aumento, lo cierto es que los estudios todavía son insuficientes, en especial cuando de suelos tropicales agrícolas se trata (Boag y Yeates 1998; Powers et al., 2009). En Costa Rica, una buena parte de la investigación sobre la biota edáfica se ha realizado en áreas de bosque y sobre algunas especies. Carney et al. (2016) analizaron la diversidad de los fosfolípidos en el suelo para estimar la influencia de la composición vegetal en la comunidad microbiana en la Estación Biológica la Selva. Por su lado, Becklund et al. (2016), estudiaron la capacidad supresiva de tres especies de *Streptomyces* aisladas del Parque Nacional Santa Rosa y Palo Verde.

En cuanto a las investigaciones en suelos agrícolas existen algunas iniciativas. Cleveland et al. (2003) estudiaron el efecto del cambio de uso del suelo de bosque a pasturas sobre la masa microbiana, y determinaron que en los bosques las comunidades microbianas eran mayores y más activas que la respuesta de la biota al cambio acorde con el tipo de suelo, así como también que los cambios observados influyeron en los ciclos de nutrientes y la disponibilidad de éstos para la planta. También Eaton et al. (2012), estudiaron comunidades microbianas en suelos costarricenses con bosques secundarios y pasturas, y las relacionaron con el ciclado de macronutrientes y la capacidad de los suelos como reserva de carbono.

Algunas iniciativas intentan comparar la biota edáfica en suelos agrícolas con diferente manejo. En plantaciones bananeras costarricenses Ferris et al. (2012) estudiaron las comunidades bióticas del suelo, y apuntan a que las prácticas que fomenten el aumento de la diversidad aumentaran también las funciones de los organismos como reguladores, sin embargo, menciona la necesidad de estudios sobre sistemas en transición y las prácticas destinadas a facilitar esa transición. Lopes & Fernandes (2020) encontraron cambios en la estructura de las comunidades microbianas en suelos tropicales en Brasil expuestos a diferentes tipos de manejo. Sin embargo, estos cambios no correspondían a un incremento en las propiedades físicas del suelo o complejidad de los sistemas de cultivo. Mas aun, los autores indican que sus resultados demuestran que la estructura de las comunidades microbiana y los perfiles fisiológicos son respuestas específicas a las condiciones ambientales y manejo del suelo, por lo que resaltan la necesidad de más estudios para comprender mejor estas interacciones complejas.

Finalmente, estudios recientes proponen que la microbiota del suelo sea un factor más en los programas de mejoramiento de los cultivos, con técnicas que permitan la transferencia de estos microorganismos a las siguientes generaciones de plantas (Wei & Jousset, 2017)

## 5 Materiales y Métodos

**Colecta de Muestras.** Un total de 15 lotes de piña y 11 zonas no dedicadas al cultivo (bosques y plantaciones forestales) cercanos al cultivo, fueron muestreados en la Región Huetar Norte. La mayoría de las plantaciones de piña estaban manejadas convencionalmente, tres estaban bajo labranza mínima y cuatro recibían materia orgánica. En cada uno de los lotes y bosques se definieron tres transectos de 100 m de longitud, y a lo largo del transecto, equidistantes entre sí, se colectaron tres núcleos de suelo, considerando además raíces, con un barreno tipo Edelman de 6 cm de ancho y a una profundidad de 20 cm, esto para obtener una muestra compuesta.

Todas las herramientas utilizadas fueron lavadas con agua y esterilizadas con alcohol, esto para evitar contaminación cruzada entre colectas. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas y fueron trasladadas en cajas de aislamiento térmico al Laboratorio de Nematología en el Campus Tecnológico Local San Carlos (CTLSC), donde se homogenizaron con suavidad. Una submuestra de 10 g fue separada y trasladada al Laboratorio de Biología Molecular para los análisis de comunidades microbianas. Además, una submuestra de 1 kilo se utilizó para análisis físico-químico del suelo en el laboratorio de análisis químicos del ITCR. Las muestras destinadas a análisis molecular fueron almacenadas a -50°C hasta su uso.

**Caracterización de las comunidades bacterianas y fúngicas.** Una vez en el laboratorio de Biología Molecular, aproximadamente 0,1 g de muestra fue colocado en un tubo de 2 ml y homogenizados. Para la extracción del ADN ambiental, se utilizó el protocolo descrito por Echeverría-Beirute et al. (2021). Este protocolo fue evaluado y validado en el Laboratorio de Biología Molecular, como parte del trabajo final de graduación de una estudiante de la Escuela de Agronomía. En resumen, en un tubo de microcentrífuga de 2 ml se colocó 0.5 g de suelo con un balín de 1g (0,5 mm diámetro), 750 µl de buffer de extracción y 250 µl de SDS al 10%, se homogenizó en un vórtex durante 10 min a 2 200 rpm. Posteriormente se colocó en incubación a 65 ° C durante 10 min, se homogenizó 1 min en vortex a 2 200 rpm y colocó nuevamente a incubar otros 10 min a 65 ° C y se centrifugó a 14 500 rpm durante 20 min. Se transfirió el sobrenadante inmediatamente en dos nuevos tubos de microcentrífuga rotulados y se agregó 1 volumen de cloroformo-alcohol-isoamílico, se homogenizó en vortex a 2 200 rpm durante 10 segundos y se incubó a 4 ° C durante 10 min. Luego, se centrifugó a 14 500 rpm 20 min y se transfirió el sobrenadante inmediatamente en dos nuevos tubos de microcentrífuga, se agregó 1 volumen de isopropanol y se homogenizó en vortex a 2 200 rpm

durante 10 segundos y se incubó a -20 °C durante 1h. Después de la incubación se centrifugó a 14 500 rpm durante 20 min se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 750 µl de etanol 75%, se mezcla con vortex por 10 segundos a 2 200 rpm y se centrifugó 1 min a 14 500 rpm (se repitió el procedimiento anterior dos veces más). Por último, se secó el precipitado en una centrifuga al vacío durante 20 min a 30 °C. Las muestras de ADN resultantes fueron cuantificadas mediante espectrometría con un Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Las muestras de ADN fueron normalizadas a una concentración final de 40 ng/µl.

La preparación de bibliotecas génicas se realizó siguiendo el protocolo “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” de la casa comercial Illumina (Illumina, CA, USA). En este protocolo se amplifican las regiones variables V3 y V4 del gen ribosomal 16S en un solo amplicon de aproximadamente 460 bp. Se trabajo con bibliotecas con insertos de 550 bp, las cuales fueron secuenciadas utilizando la plataforma MiSeq 2x300 de Illumina. La preparación de las bibliotecas y los servicios de secuenciación fueron proporcionados por el Laboratorio de Ciencias Genómicas (GSL) de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NC) (NC, USA). La calidad de las secuencias obtenidas fue evaluada con FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). Las secuencias adaptadoras fueron removidas y las lecturas pareadas fueron filtradas y recortadas para garantizar una calidad superior a 20 (Phred score) y longitud mínima de 285 bp utilizando Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014).

A partir de estas secuencias se infirieron las variantes en la secuencia de amplicon (ASVs por sus siglas en inglés) usando DADA2 (Callahan et al. 2016), según su implementación en el software Qiime2 versión 2020.8.0 (Bolyen et al., 2019). Las ASVs son similares a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés), sin embargo, a diferencia de las OTUs, las ASVs no responden a un agrupamiento basado en valor de disimilitud preestablecido. Esto quiere decir que cada ASVs representa una unidad taxonómica específica y no depende de la base de datos utilizada para su clasificación. Adicionalmente, el uso de ASVs aumenta la reproducibilidad y reusabilidad de los datos (Callahan et al., 2017). Se utilizó el clasificador silva-138-99-nb (Bokulich et al., 2018) y la base de datos Silva (Quast et al., 2012) para la asignación taxonómica de las ASVs. Para cada muestra se estimó la abundancia y composición de especies.

### **Caracterización de las comunidades nematológicas.**

Luego de la homogeneización de cada muestra de suelo, se extrajeron los nematodos de 200 g usando un elutriador de Oostenbrink (Oostenbrink, 1960), y luego se realizó la separación de los nematodos por el método de flotación – centrifugación (Coolen, 1979). Una vez extraídos, el número total de nematodos por muestra se contó bajo un microscopio invertido, seguidamente los nematodos fueron fijados en formaldehído al 4% caliente, y transferidos a glicerina pura usando el método de Seinhorst (1966). Una vez contados y fijados, al menos

el 20% de los nematodos en cada muestra, los primeros en la cámara fueron montados e identificados a nivel de familia o género bajo un microscopio compuesto.

A continuación, se calculó la abundancia y frecuencia para cada familia o género, se construyeron curvas de rango-abundancia (Wilson, 1991), y se determinó la relación entre las características químicas del suelo y la composición de la comunidad de nematodos mediante un análisis de redundancia (RDA).

Para determinar diferencias se utilizó análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones de medias utilizando la prueba de rango estudentizado (HSD) de Tukey. Los datos fueron previamente transformados con Hellinger para satisfacer la condición de normalidad y homogeneidad de varianza. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el software R Statistical (4.1.1). Las diferencias con  $p < 0,05$  se consideraron significativas.

**Análisis de la diversidad biológica y determinación de indicadores.** Para las comunidades microbianas se estimó la diversidad alfa utilizando el índice de Shannon (Shannon & Weaver, 1949) y la diversidad filogenética de Faith (Faith, 1992). Para el cálculo de diversidad beta se utilizó la disimilaridad de Bray-Curtis (Sorenson, 1948) y la distancia no ponderada UniFrac (Lozupone & Knight, 2005). Ambos análisis fueron realizados con la herramienta Qiime2 versión 2020.8.0 (Bolyen et al., 2019), utilizando una profundidad de muestreo de 85000 lecturas por muestra. Para determinar diferencia en la diversidad alfa entre tipos de uso del suelo se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones pareadas. Para determinar diferencias en diversidad beta se utilizó un análisis multivariado permutacional de varianza (PERMANOVA, por sus siglas en inglés) con 999 permutaciones. Finalmente, para determinar diferencias en la abundancia de las diferentes taxa, se realizó un análisis de abundancia diferencial utilizando las ASVs clasificadas al nivel de género y la prueba de Wald con una distribución binomial negativa, según la implementación del paquete DESeq2 (Love et al., 2014) en lenguaje estadístico R. Todos los análisis estadísticos se realizaron desde Qiime2. Las diferencias con  $p < 0,05$  se consideraron significativas.

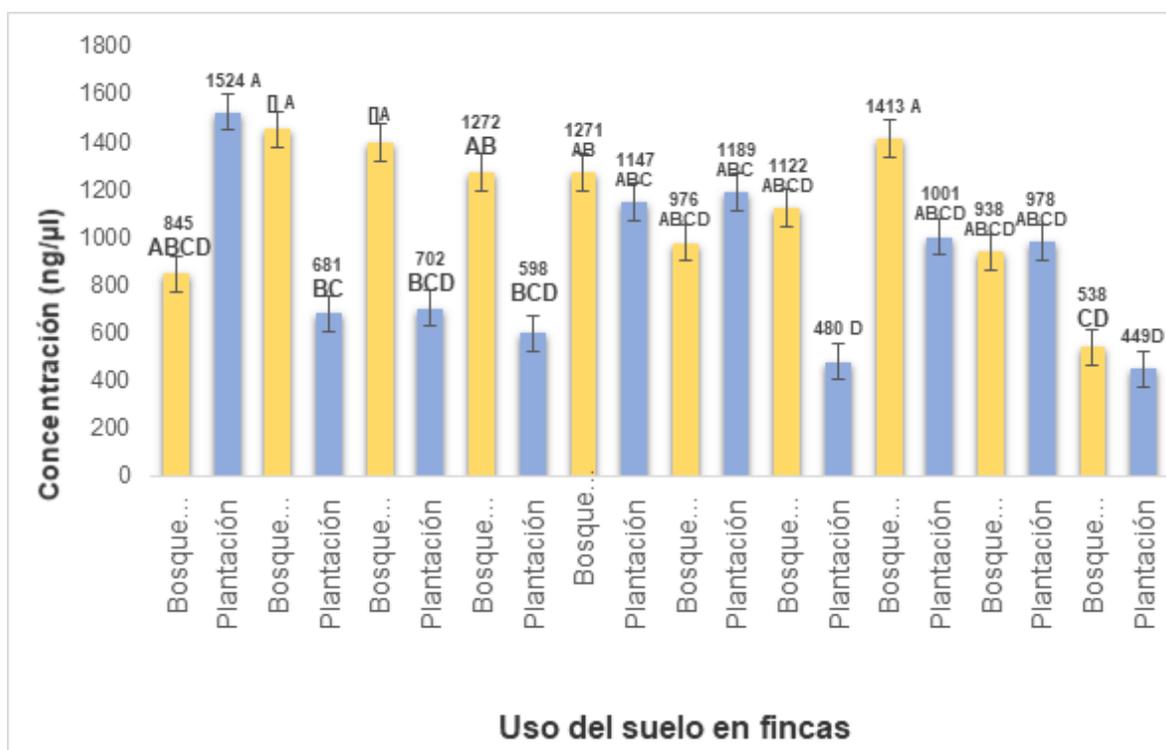
Para calcular los índices de la comunidad de nematodos, cada género fue asignado a un grupo trófico según Yeates et al. (1993), y un grupo cp (colonizadores-persistentes) según Bongers (1990) y Bongers & Bongers (1998). Los grupos cp representan diferentes estrategias de sobrevivencia para los nematodos. Con base en los grupos de cp, se calcularon el índice de madurez y el índice de fitoparásitos (Bongers, 1990), y con base en cp + grupos tróficos, los índices de la red trófica del suelo (Ferris et al. 2001): el índice basal, el índice de enriquecimiento, el índice del canal, y el índice de estructura. Las huellas metabólicas: compuesta, de enriquecimiento y de estructura, se calcularon de acuerdo con Ferris (2010). Todos los índices se calcularon utilizando la herramienta NINJA: análisis conjunto de indicadores de nematodos (Sieriebriennikov et al., 2014).

En ambos casos se analizaron los datos en busca de relaciones entre el uso del suelo, el grado de intervención humana, así como las características de las comunidades biológicas.

## 6 Resultados

### Protocolo de extracción del ADN ambiental.

De las fincas muestreadas, 10 presentaron tanto cultivo como bosque asociado. La comparación del ADN extraído de suelo con diferentes usos de suelo (bosque versus plantación), determinó que sí existen diferencias significativas ( $p=0,0368$ ) (**Figura 1**) para la variable concentración ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Las variables de calidad no se encontraron diferencias significativas reportándose para calidad 260/280 ( $p=0,3831$ ) y 260/230 ( $p=0,6704$ ).



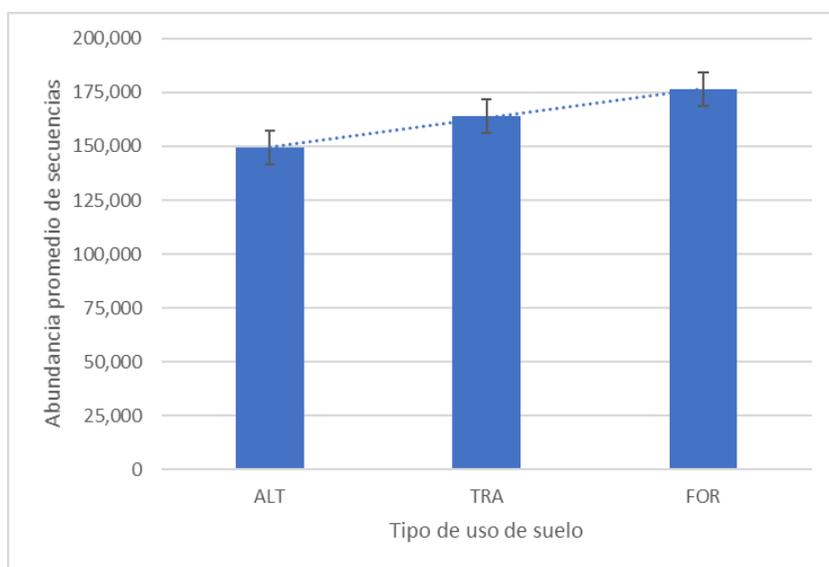
**Figura 1.** Comparación de promedios de Concentración del ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) (media  $\pm$  EE) extraído de distintas fincas con diferentes usos de suelo en la Zona Norte. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí LSD Fisher ( $p < 0,05$ ).

Se pudo observar que la mayoría de los suelos de los bosques de las fincas estudiadas presentaron concentraciones más altas de ADN en comparación a los suelos de plantaciones. Sin embargo, este efecto no fue generalizado, con tres fincas donde el comportamiento fue contrario.

## Caracterización de las comunidades biológicas del microbioma en los suelos de plantaciones de piña, diversidad biológica y efecto de los diferentes tipos de uso del suelo en la composición taxonómica de tales comunidades.

### *Secuenciación de ADN ambiental e inferencia de ASVs*

En este estudio, después del control de calidad de las lecturas de ADN (*i.e.* corrección de errores de secuenciación, eliminación de secuencias de baja calidad y secuencias quiméricas), se generaron en promedio 166331 secuencias por muestra. Aunque los valores de abundancia de secuencias obtenidas son fluctuantes, en términos generales las muestras de bosque tienden a presentar mayores abundancias de secuencias, mientras las muestras de plantaciones bajo un manejo alternativo tienden a presentar menores abundancias de secuencias (Figura 2). Sin embargo, se presentan algunas excepciones notables. Por ejemplo, el sitio de colecta con menor abundancia absoluta de secuencias corresponde a un fragmento de bosque secundario, mientras el sitio con la mayor abundancia absoluta corresponde a una plantación bajo un manejo tradicional del suelo. A partir de todas estas secuencias, fue posible inferir un total 6046 ASVs o unidades taxonómicas diferentes.

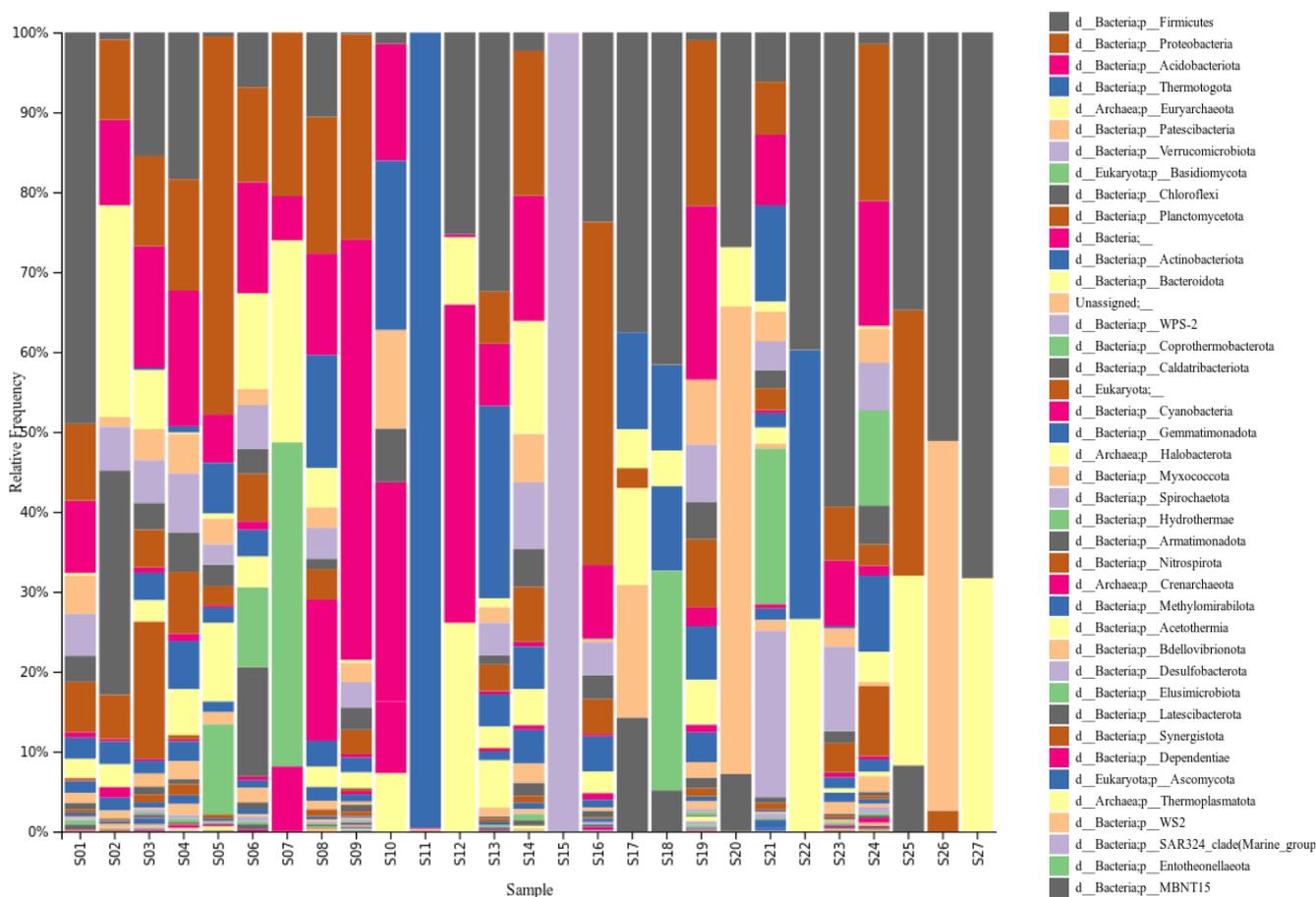


**Figura 2.** Abundancia de secuencias no quiméricas según su distribución en tres tipos distintos de uso del suelo. FOR: terrenos aledaños a las plantaciones de piña con cobertura forestal y baja intervención antropogénica, TRA: plantaciones de piña bajo manejo convencional del suelo, ALT: plantaciones de piña bajo un manejo alternativo del suelo, esto incluye la aplicación de materia orgánica y mínima labranza.

### *Composición taxonómica de las comunidades biológicas del microbioma*

Las muestras presentan una composición taxonómica heterogénea, con solo dos notables excepciones. Esto es una muestra plantación de piña bajo manejo convencional (S11) cuya

composición es mayoritariamente por organismos del filo Thermotogota, pero también presenta Cyanobacteria y organismos no clasificados. La segunda excepción corresponde a una muestra de bosque (S15) que está compuesta casi en su totalidad (99%) por organismos del filo candidato WPS-2, también conocido como Eremiobacterota. Sin embargo, en términos generales a nivel de filo, los grupos de bacterias y arqueas con mayor representación a través de todas las muestras corresponden a Firmicutes, Proteobacteria, Acidobacteriota, Thermotogota, Euryarchaeota, Patescibacteria y Verrucomicrobiota. En cuanto a los grupos fúngicos, los fila Basidiomycota y Ascomycota se encuentran presentes pero en mucho menor abundancia relativa que los grupos bacterianos (Figura 3).



**Figura 3.** Frecuencia relativa de los diferentes taxa por muestra provenientes de tres tipos distintos de uso del suelo. Las muestras S01, S03, S05, S08, S10, S13, S15, S16, S20, S22 y S25 corresponden suelos de terrenos aledaños a las plantaciones de piña con cobertura forestal y baja intervención antropogénica. Las muestras S02, S04, S07, S09, S11, S12, S14, S17, S21, S23, S27 corresponden plantaciones de piña bajo manejo convencional del suelo, mientras las muestras S06, S18, S19, S24 y S26 corresponden a plantaciones de piña bajo un manejo alternativo del suelo, esto incluye la aplicación de materia orgánica y mínima labranza.

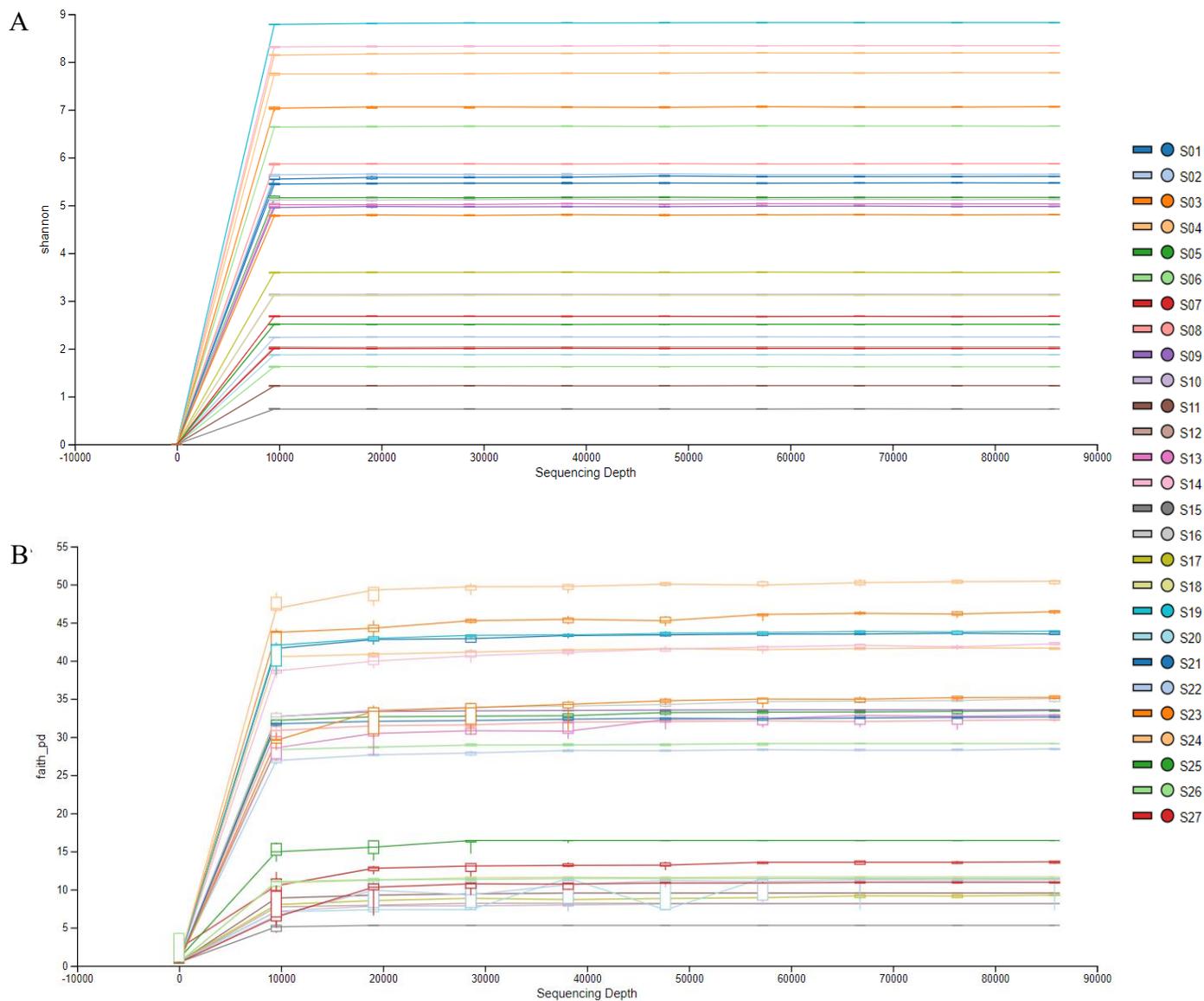
A nivel de género, los microbios que se presentan en mayores abundancias corresponden a la cepa DTU014 del género *Clostridia*, *Methanothermobacter*, *Hydrogenispora*, *Acinetobacter*, *Caldatribacterium*, *Bryocella*, *Defluviitoga*, *Streptococcus*, *Acidisphaera*, *Coprothermobacter*, *Caldicellulosiruptor* y *Rickettsia*. En cuanto a los grupos fúngicos, el único género que sobresale es *Cladosporium*. Pese a que estos microorganismos presentan abundancias relativamente mayores, en comparación con otros grupos, su distribución es homogénea a través de las muestras, por lo que no se presentan diferencias estadísticamente significativas en términos de abundancia diferencia entre los distintos tipos de uso del suelo. Esto es, no hay un solo grupo taxonómico que domine o se asocie a un tipo de manejo del suelo en particular (bosques, plantaciones bajo manejo tradicional o plantaciones bajo manejo alternativo).

#### *Diversidad alfa y beta en las comunidades biológicas del microbioma*

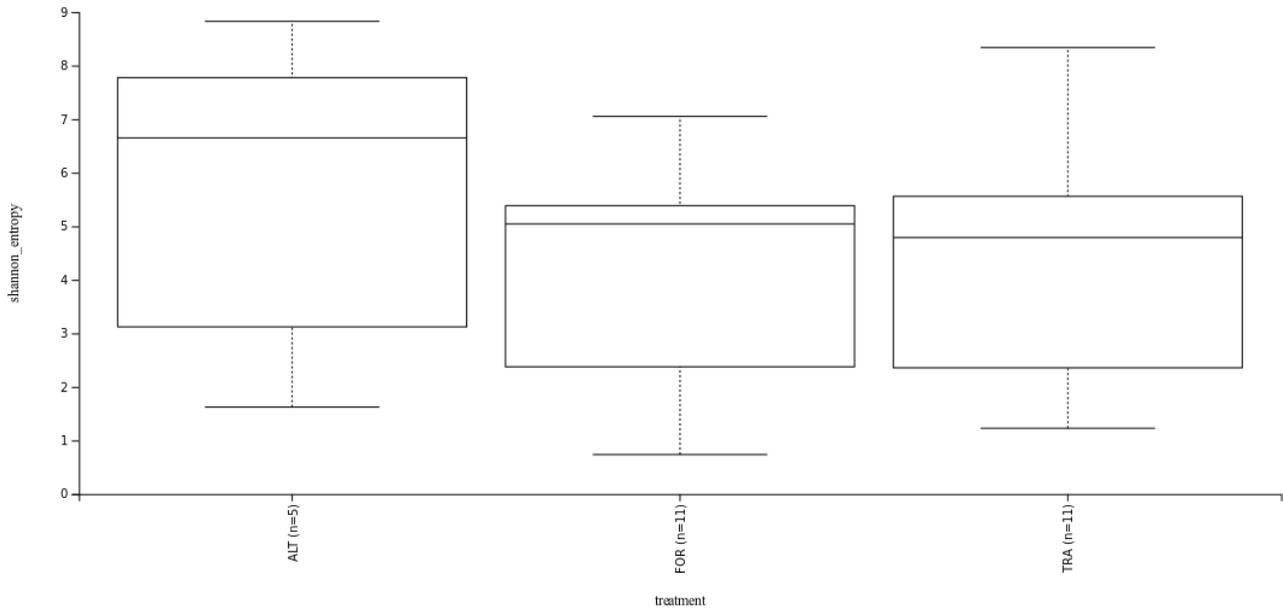
Para garantizar que se obtuvo una representación adecuada de la diversidad presente en cada sitio, se estimaron las curvas de rarefacción con base en los valores del índice de Shannon y la diversidad filogenética de Faith (Figura 4). Los resultados demuestran que para ambas métricas, la diversidad máxima se alcanza con una profundidad de secuenciación entre 10000 y 20000 secuencias por muestra. Para este estudio, los datos fueron normalizados y se estableció una profundidad de muestreo de 85000 secuencias, por lo que se considera que los resultados obtenidos son representativos de la biodiversidad presente en las muestras.

En términos de diversidad alfa, se muestra una tendencia a mayor diversidad dentro de las muestras provenientes de suelos en plantaciones de piña con manejo alternativo. La diversidad alfa se refiere a la riqueza de especies que se pueden encontrar dentro de una muestra, en este caso agrupadas según tipo de uso del suelo. Nuestros resultados indican que el uso de materia orgánica y mínima labranza son prácticas que podrían favorecer la diversidad de microorganismos. Sin embargo, es importante señalar que aunque esta tendencia es biológicamente significativa, no se encontraron diferencias estadísticas entre los valores de entropía de Shannon ( $H = 1.04$ ,  $p = 0.59$ ) (Figura 5). Estos resultados son consistentes con las curvas de rarefacción donde las muestras de suelo bajo manejo alternativo tienen a alcanzar valores superiores de diversidad antes de alcanzar la saturación.

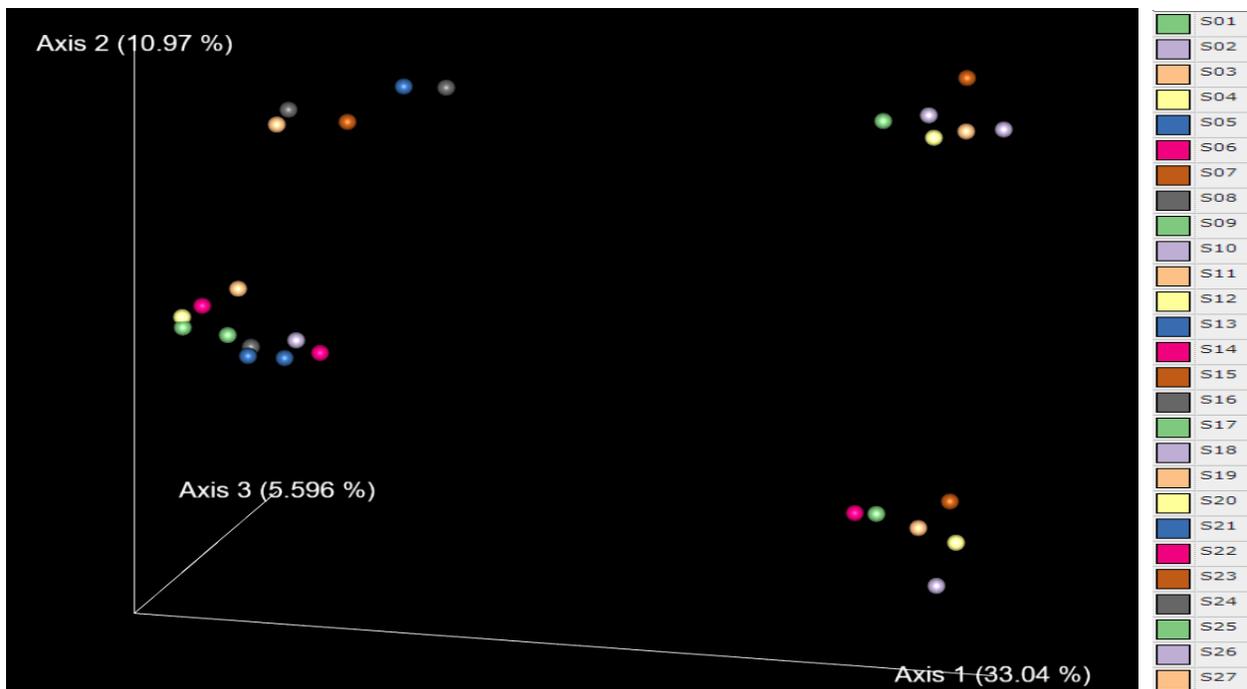
Un caso similar ocurre cuando estimamos la diversidad beta. La diversidad beta se refiere a la similitud o disimilitud entre comunidades biológicas, esto con base en su composición taxonómica. La prueba de PERMANOVA demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades (pseudo-F = 0.61,  $p = 0.96$ ), esto cuando se agrupan las muestras según el tipo de uso de suelo. Con base en los valores de distancia no ponderada UniFrac, los cuales parten de las relaciones filogenéticas observadas, el factor preponderante en la similitud de las muestras es la ubicación geográfica de la colecta, por encima del tipo de uso del suelo (Figura 6).



**Figura 4.** Curvas de rarefacción con base en los valores del índice de Shannon (A) y la diversidad filogenética de Faith (B). Las muestras S01, S03, S05, S08, S10, S13, S15, S16, S20, S22 y S25 corresponden suelos de terrenos aledaños a las plantaciones de piña con cobertura forestal y baja intervención antropogénica. Las muestras S02, S04, S07, S09, S11, S12, S14, S17, S21, S23, S27 corresponden plantaciones de piña bajo manejo convencional del suelo, mientras las muestras S06, S18, S19, S24 y S26 corresponden a plantaciones de piña bajo un manejo alternativo del suelo, esto incluye la aplicación de materia orgánica y mínima labranza.



**Figura 5.** Diversidad alfa por tipo de uso de suelo. FOR: terrenos aledaños a las plantaciones de piña con cobertura forestal y baja intervención antropogénica, TRA: plantaciones de piña bajo manejo convencional del suelo, ALT: plantaciones de piña bajo un manejo alternativo del suelo, esto incluye la aplicación de materia orgánica y mínima labranza.



**Figura 6.** Gráfico EMPeror PCA de las distancias no ponderadas Unifrac de muestra provenientes de tres tipos distintos de uso del suelo.

**Caracterización de las comunidades de nematodos en los suelos de plantaciones de piña y comparación de la composición taxonómica de tales comunidades en los diferentes tipos de uso del suelo.**

En este estudio se identificaron 43 familias y ocho órdenes de nematodos, 39 familias se encontraron en bosque, 36 en plantaciones de árboles y 35 en plantaciones de piña (cuadro 1). La abundancia media por muestra fue de 970 individuos en 200 g de suelo. La alta variabilidad fue frecuente para todas las variables medidas, lo que dificultó encontrar diferencias significativas. En el caso de las abundancias medias, estas oscilaron entre 75 y 3086 individuos/200 g de suelo. El bosque tendió a tener mayor abundancia (rango de 255 a 1821) que la plantación de piña (rango de 74 a 2077), pero no se encontró diferencia significativa entre ellos.

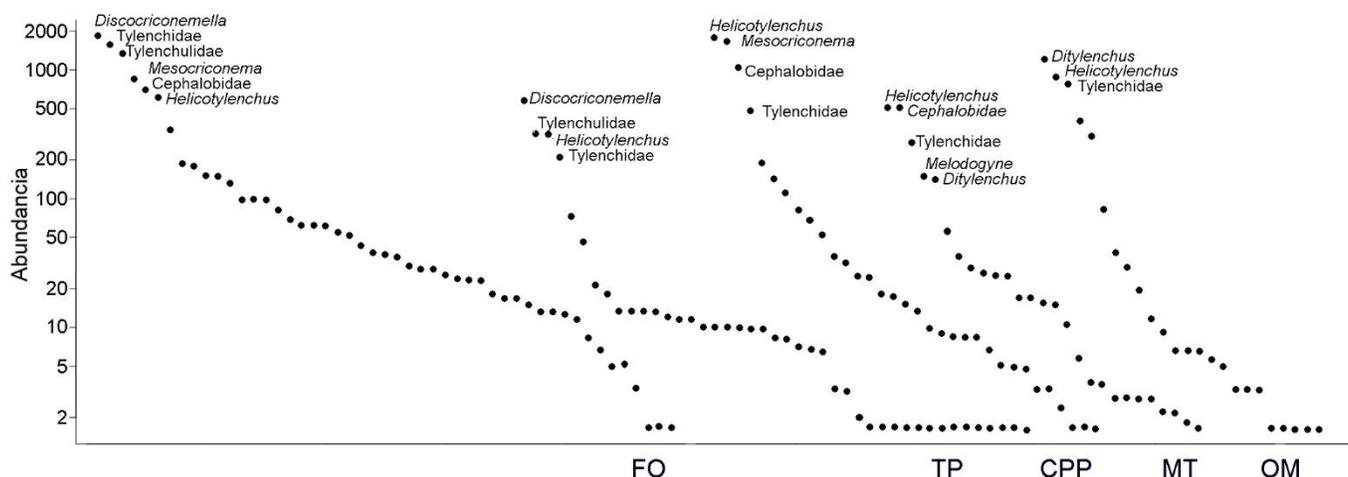
**Cuadro 1.** Abundancia y frecuencia de familias y géneros, para los diferentes usos del suelo estudiados. La abundancia está expresada como número medio de individuos en 200 g de suelo, la frecuencia se muestra entre paréntesis e indica el número de sitios en los cuales el grupo taxonómico estuvo presente. Gremios funcionales (FG) b = bacterívoros; f = fungívoros; o = omnívoros; p = depredadores; y h = fitófagos. Los números del 1 al 5 representan los valores cp. FO: bosque, TP: plantaciones forestales, CPP piña con manejo convencional, MT: piña bajo labranza mínima, OM: piña con adición de materia orgánica. \* Indica las familias y géneros que no fueron encontrados en las plantaciones de piña. Las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), en caso de encontrarse, se indican con letras a la derecha de cada columna.

Family/genus	FG	FO (n=8)		TP (n=3)		CPP (n=8)		MT (n=3)		OM (n=4)	
Achromadoridae*	o3	3 (1)		1 (1)		-		-		-	
Actinolaimidae*	o4	1 (2)		1 (1)		-		-		-	
Aporcelaimidae/ <i>Aporcelaimellus</i>	o5	1 (5)		1 (1)		1 (1)		-		-	
Aporcelaimidae/ <i>Aporcelinus</i>	o5	8 (4)	ab	3 (2)	ab	1 (1)	a	8 (3)	b	1 (3)	b
Aporcelaimidae/ <i>Makatinus</i> *	o5	2 (4)		1 (1)		-		-		-	
Aporcelaimidae/ <i>Metaporcelaimus</i>	o5	2 (4)		2 (2)		1 (3)		1 (1)		1 (1)	
Aporcelaimidae/ <i>Sectonema</i> *	o5	1 (2)		-		-		-		-	
Belonidiridae/ <i>Metaxonchium</i>	h5	8 (5)		6 (1)		1 (1)		-		-	
Belonidiridae	h5	22 (7)	a	24 (3)	a	4 (2)	b	1 (1)	b	-	
Discolaiminae*	p5	1 (2)		-		-		-		-	
Dorylaimidae	o4	8 (7)		4 (2)		1 (4)		10 (2)		10 (3)	
Leptonchidae	f4	-		-		-		-		2 (1)	
Longidoridae/ <i>Longidorus</i> *	h5	8 (4)		1 (1)		-		-		-	
Longidoridae/ <i>Xiphinema</i> *	h5	6 (2)		4 (1)		-		-		-	
Nordiidae*	o4	1 (1)		-		-		-		-	

Qudsianematinae	o4	5 (5)		1 (1)		-		7 (1)		2 (1)	
Thornenematidae	o5	2 (3)		4 (1)		-		-		1 (1)	
Tylencholaimellidae	f4	-		-		-		2 (1)		-	
Tylencholaimidae	f4	2 (4)		3 (1)		1 (2)		-		1 (1)	
Alaimidae	b4	19 (5)		7 (2)		3 (6)		1 (1)		2 (1)	
Anatonchidae/ <i>Iotonchus</i>	p4	5 (3)		3 (2)		2 (3)		1 (2)		1 (1)	
Mononchidae/ <i>Clarkus</i>	p4	4 (4)		2 (2)		1 (1)		-		-	
Mononchidae/ <i>Coomansus</i> *	p4	5 (3)		1 (1)		-		-		-	
Mylonchulidae/ <i>Mylonchulus</i>	p4	7 (3)		3 (2)		1 (2)		-		-	
Aphanolaimidae/ <i>Aphanolaimus</i> *	b3	4 (6)		4 (2)		-		-		-	
Metateratocephalidae/ <i>Euteratocephalus</i>	b3	4 (1)		-		1 (1)		1 (1)		-	
Odontolaimidae*	b3	-		3 (1)		-		-		-	
Plectidae/ <i>Plectus</i>	b2	3 (5)		1 (1)		1 (2)		1 (1)		2 (2)	
Plectidae/ <i>Wilsonema</i>	b2	2 (3)		2 (1)		1 (2)		-		-	
Bunonematidae	b1	1 (1)		1 (1)		2 (2)		-		-	
Cephalobidae/ <i>Acrobeles</i>	b2	1 (1)		1 (1)		2 (3)		5 (1)		1 (1)	
Cephalobidae	b2	87 (8)	a	69 (3)	a	114 (9)	b	147 (3)	b	100 (4)	ab
Diploscapteridae	b1	3 (2)		1 (1)		1 (1)		5 (1)		-	
Mesorhabditidae	b1	2 (3)		1 (1)		1 (2)		1 (2)		1 (1)	
Panagrolaimidae	b1	-		-		-		1 (1)		-	
Protorhabditidae	b1	1 (2)		1 (2)		-		16 (1)		1 (1)	
Rhabditidae	b1	12 (5)		4 (2)		1 (2)		7 (3)		1 (1)	
Teratocephalidae/ <i>Teratocephalus</i> *	b3	1 (1)		-		-		-		-	
Diphtherophoridae/ <i>Diphtherophora</i>	f3	12 (7)	ab	15 (3)	a	3 (6)	b	-		1 (1)	b
Prismatolaimidae/ <i>Prismatolaimus</i>	b3	12 (6)		1 (1)		3 (2)		-		-	
Tobrilidae*	p3	-		1 (1)		-		-		-	
Trichodoridae	h4	4 (4)		3 (2)		1 (2)		-		-	
Tripylidae	p3	2 (5)		1 (2)		1 (2)		-		-	
Anguinidae/ <i>Ditylenchus</i>	f2	10 (5)		3 (2)		21 (7)		41 (2)		305 (4)	
Aphelenchidae/ <i>Aphelenchus</i>	f2	16 (5)		1 (1)		16 (6)		8 (2)		5 (1)	
Aphelenchoididae/ <i>Aphelenchoides</i>	f2	23 (7)		4 (2)		6 (7)		5 (3)		21 (4)	
Criconematidae/ <i>Mesocriconema</i>	h3	105 (6)		-		184 (9)		3 (2)		76 (3)	
Criconematidae/ <i>Discocriconemella</i>	h3	230 (6)	a	1070 (2)	a	1 (2)	b	-		1 (1)	b
Heteroderidae/ <i>Meloidogyne</i>	h3	42 (8)	a	3 (3)	b	7 (5)	b	43 (3)	ab	3 (3)	ab
Hoplolaimidae/ <i>Helicotylenchus</i>	h3	76 (8)		106 (3)		194 (9)		147 (3)		222 (4)	

Pratylenchidae/ <i>Pratylenchus</i>	h3	18 (7)		4 (1)		12 (7)		4 (2)		7 (4)
Telotylenchidae	h3	3 (2)		-		-		1 (1)		-
Tylenchidae	h2	193 (8)		104 (3)		53 (9)		79 (3)		195 (4)
Tylenchulidae	h3	165 (8)		191 (3)		9 (7)		1 (1)		1 (2)

Las curvas de rango abundancia (Figura 7) muestran los géneros más abundantes para cada uso del suelo. La dominancia fue más alta en las plantaciones de piña y forestales. En piña, *Helicotylenchus* fue el género más abundante y representó entre 23 y 28% del total de los individuos. Además, más del 80% de los individuos pertenecen a solo cinco familias: Hoplolaimidae (*Helicotylenchus*), Criconematidae (*Mesocriconema*), Cephalobidae, Tylenchidae y Anguinidae (*Ditylenchus*). En plantaciones de árboles y en bosques, *Discocriconemella* fue el género más abundante. La curva para el bosque fue más suave y el 80% de los individuos pertenecen a siete familias, lo que sugiere una menor dominancia.



**Figura 7.** Curvas de rango-abundancia para los nematodos asociados a los diferentes usos del suelo estudiados. FO: bosque, TP: plantaciones forestales, CPP piña con manejo convencional, MT: piña bajo labranza mínima, OM: piña con adición de materia orgánica.

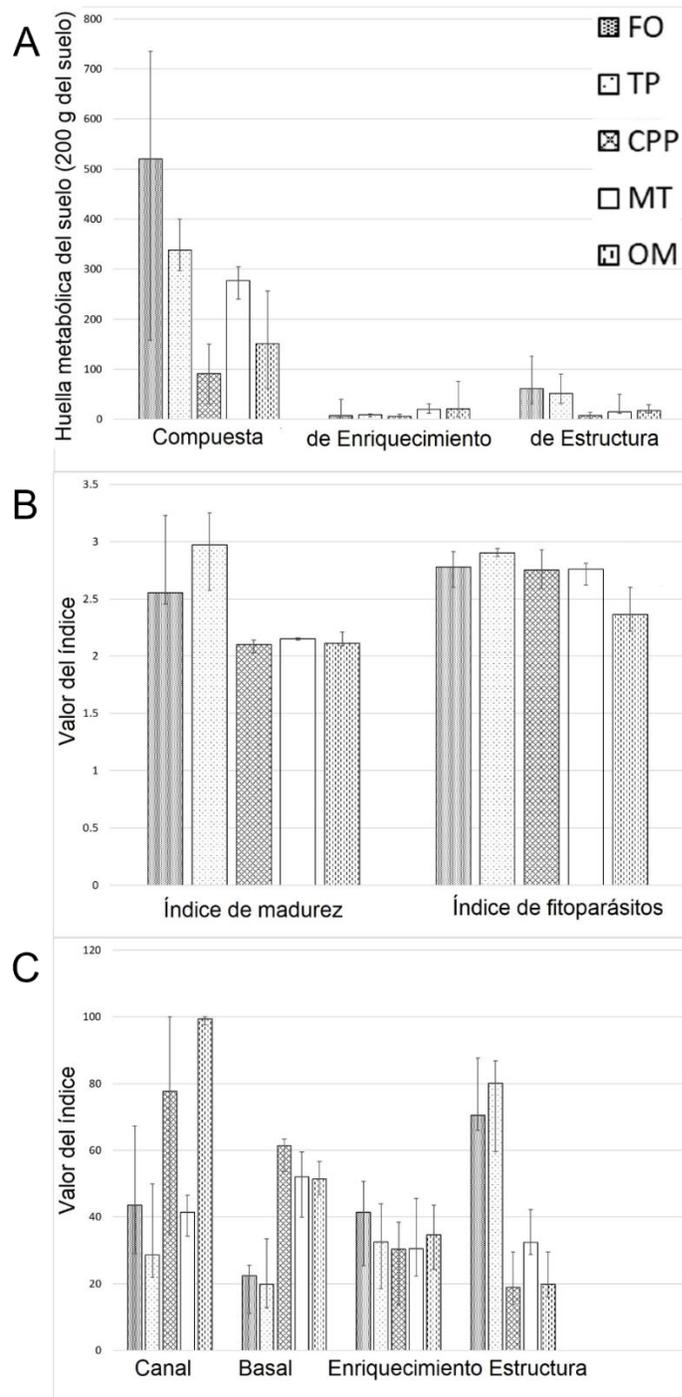
En cuanto a la abundancia y frecuencia de taxones, seis familias y siete géneros solo se encontraron en plantaciones forestales y bosques (marcados con un asterisco en el Cuadro 1), entre estos taxones, *Longidorus*, *Xiphinema*, *Coomansus* y *Aphanolaimus* presentaron la mayor frecuencia y abundancia. Asimismo, los géneros *Diphtherophora* y *Discocriconemella*, y la familia Belondiridae fueron más abundantes en plantaciones forestales y bosques que en plantaciones de piña (Cuadro 1). De manera similar, *Aporcelinus*

(Aporcelaimidae), fue significativamente diferente en los diferentes usos de suelo. Las poblaciones de este nematodo fueron menos abundantes en plantaciones de piña manejadas convencionalmente en comparación con otros tipos de uso del suelo, lo que indica que la labranza mínima y la adición de materia orgánica pueden favorecer su abundancia. Por el contrario, la única familia que fue más abundante en las plantaciones de piña fue Cephalobidae, sin diferencias significativas entre los diferentes manejos del suelo en los campos de producción de piña.

### **Diversidad biológica de los nematodos a través de indicadores y comparación de esa diversidad en los diferentes tipos de uso del suelo.**

Algunos de los índices para la comunidad de nematodos (Figuras 8) difirieron entre plantaciones y bosques, mientras que otros, como el índice de madurez y el índice de fitoparásitos (Figura 8B), no difirieron significativamente entre los usos de la tierra. El índice basal, un indicador de degradación ambiental (Ferris et al., 2001), fue menor en bosques y plantaciones de árboles ( $p=0.004$ ) en comparación con las plantaciones de piña, mientras que el índice de estructura, un indicador de redes alimentarias del suelo más estructuradas fue mayor en los bosques, pero particularmente en plantaciones de árboles ( $p=0.02$ ) (Figura 8C). No hubo diferencias estadísticas para estos índices entre las plantaciones de piña, a pesar de los distintos tratamientos de manejo del suelo, pero hubo una tendencia que merece atención, la labranza mínima podría favorecer un suelo más estructurado.

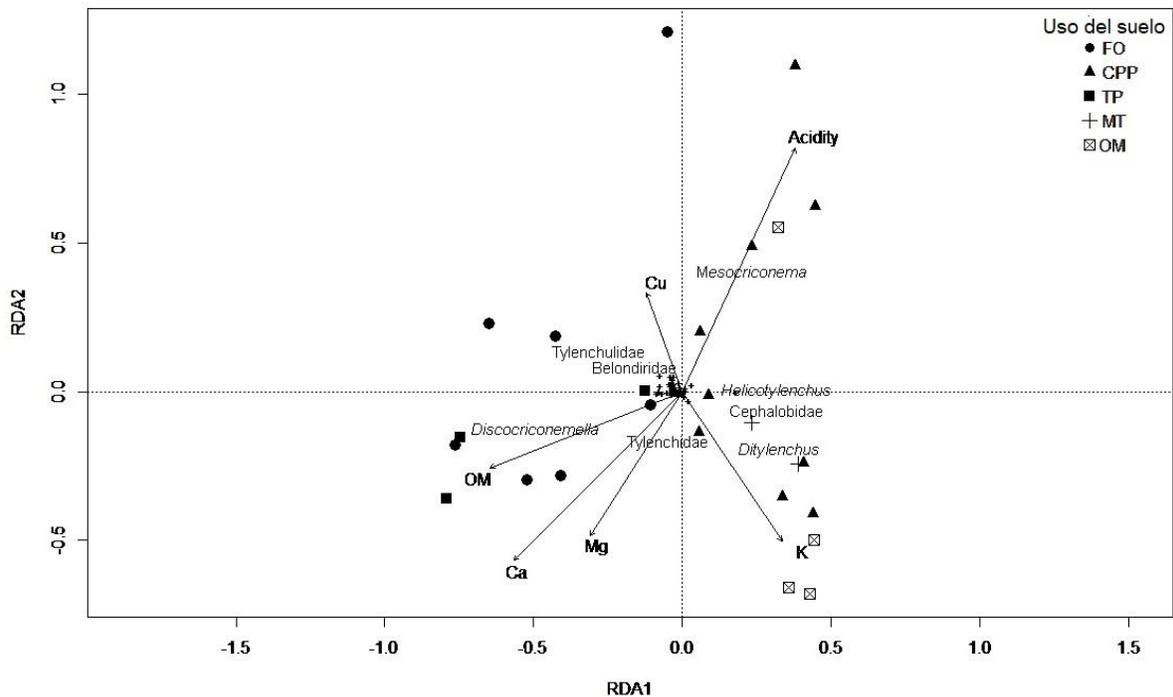
La huella metabólica (Figura 8A), tiene en cuenta los gremios funcionales, además de la biomasa de nematodos. Solo las huellas compuestas para manejo convencional y bosque difirieron significativamente ( $p=0.005$ ). Una vez más, hubo una tendencia que merece atención, el uso de labranza mínima y materia orgánica en las plantaciones de piña puede favorecer a las comunidades de nematodos del suelo con huellas metabólicas similares a las de los bosques.



**Figura 8.** Distribución de los valores de: (A) huellas metabólicas de la red trófica, (B) índices de madurez y fitoparásitos, y (C) índices de la red trófica, calculados para los diferentes usos de suelo estudiados. Las columnas representan los valores de la mediana, y las barras los percentiles 25vo y 75vo. FO: bosque, TP: plantaciones forestales, CPP piña con manejo convencional, MT: piña bajo labranza mínima, OM: piña con adición de materia orgánica.

## Comparación de las comunidades de nematodos de plantaciones de piña con diferentes tipos de uso del suelo (Objetivo 4)

El RDA (Figura 9) muestra bosques y plantaciones de árboles en el lado izquierdo de la gráfica, correlacionados con: materia orgánica, Ca y Mg en el suelo, con las poblaciones de *Discocricionemella*, y en cierta medida, con Tylenchulidae. Belonidiridae y Tylenchidae. Mientras que, las plantaciones de piña se disponen en el lado derecho de la parcela, correlacionado con la acidez intercambiable y K en el suelo, con *Mesocricionema* y en menor medida con Cephalobidae, *Ditylenchus* y *Helicotylenchus*.



**Figura 9.** Gráfico del análisis de redundancia (RDA) entre las propiedades del suelo y la abundancia de familias. Los usos del suelo están representados por formas geométricas, las familias (o géneros) por cruces, o por su nombre si la correlación es significativa. Solo las variables ambientales que fueron se correlacionaron significativamente y que no fueron redundantes fueron utilizadas en el análisis.

## 7 Discusión y conclusiones

Para lograr un adecuado análisis de microbiomas, es de vital importancia que el protocolo de extracción de ADN sea el óptimo, para obtener buena calidad y rendimiento, ya que estos rangos se pueden ver afectados por factores como lisis incompleta de la célula, extracción de ácidos húmicos presentes en el suelo y degradación del ADN posterior a su extracción. Nuestro primer artículo (Echeverría-Beirute et al., 2021) profundizó en los factores que determinan la concentración y calidad del ADN extraído de suelos tropicales. En forma general, los resultados del presente estudio demostraron que los kits comerciales de extracción de ADN no siempre son efectivos para todo tipo de suelos, como fue el caso. Además, que la conservación del suelo a muy bajas temperaturas (-40 °C) es efectiva para obtener altas concentraciones ADN. También, en el presente estudio resultó que en los suelos de bosque se encontró mayor concentración (ng/μl) que, en los suelos de cultivo, sin embargo la calidad del ADN no varió en los dos usos de suelo. El protocolo obtenido gracias a este trabajo permitió la obtención de muestras con calidad suficiente para su secuenciación y análisis posteriores.

Respecto a las comunidades de microorganismos del suelo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas en términos de diversidad alfa o beta entre los diferentes tipos de uso de suelo o prácticas de manejo. Esto es contraintuitivo, pues se ha discutido sobre como el crecimiento de la actividad piñera conlleva posibles efectos ambientales derivados, como por ejemplo la contaminación de aguas y deforestación, así como problemas que afectan la salud animal y de las comunidades circundantes (Acuña-González, 2009). Las plantaciones de pinya también han sido asociadas con problemas de erosión (Martínez López et al., 2021) y cambio en la composición química del suelo (Sherman & Brye, 2019). Por tanto, se esperaba un efecto negativo en la riqueza de especie, en particular cuando se compara con sitios de referencia, como las zonas boscosas aledañas con bajo nivel de intervención antropogénica. Sin embargo, si se observó una tendencia en cuanto al uso de prácticas alternativas, esto es, el uso de mínima labranza y la incorporación de materia orgánica aumentan la riqueza de especies, aunque la abundancia relativa no se ve afectada. Wang et al. (2016) estudiaron el efecto de diferentes técnicas de labranza en la diversidad de bacterias del suelo y encontraron que las técnicas de conservación del suelo (*e.g.* mínima labranza) aumentaban la abundancia de grupos funcionales de bacterias beneficiosas.

Entre los principales grupos microbianos reportados en este estudio, los filo Firmicutes, Proteobacteria y Acidobacteriota, son los que presentan el mayor potencial para ser utilizados como indicadores relevantes de la calidad y sanidad del suelo.

El filo Firmicutes es uno de los más comúnmente encontrados en la rizosfera de plantas e incluye a los géneros tales como *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Oceanobacillus*, *Planococcus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Virgibacillus*, *Terribacillus*,

*Staphylococcus*, *Jeotgalibacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Exiguobacterium*, *Piscibacillus*, *Gracibacillus*, *Fictibacillus* y *Viridibacillus*. Estos géneros de bacterias cumplen funciones ecológicas muy diversas, incluida la promoción del crecimiento en plantas (biofertilizantes), biocontroladores de patógenos en plantas, así como participan en procesos de fitorremediación y absorción de metales pesados (Hashmi et al. 2020).

El filo Proteobacteria es un grupo metabólicamente diverso compuesto por cinco subgrupos, de los cuales las  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -proteobacteria son comunes en muestras de suelo. Mas importante aún, miembros de grupo de  $\beta$ -proteobacteria participan en la mediación de procesos de nitrificación, mientras miembros del grupo  $\gamma$ -proteobacteria, el cual incluye a las *Pseudomonas*, participan en la metabolización de diversos compuestos de carbono. Finalmente, el grupo de las  $\delta$ -proteobacteria consiste mayoritariamente de bacterias que participan en la reducción de hierro y sulfatos (Zhang & Xu, 2008).

El filo Acidobacteriota, como su nombre lo indica, esta compuesto por microorganismos que viven en ambientes acídicos. Por tanto, pueden ser utilizados como indicadores de la acidez del suelo, ya que su rango de sobrevivencia se encuentra entre pH de 3.5 a 5.5, con un crecimiento optimo en 4.5. Los microorganismos de este filo participan en la descomposición tanto de compuestos de carbono simples como polisacáridos microbianos, incluso algunas especies tiene la capacidad de fermentar celulosa. Un par de especies han sido reportadas con anaeróbicas facultativas, pero el resto se consideran bacterias aeróbicas y quimioheterótrofas (Campbell, 2014).

Respecto a las comunidades nematológicas, este acercamiento inicial a la fauna de nematodos en plantaciones de piña en la RHN, arrojó hallazgos que merecen atención. La variabilidad en la abundancia, los cambios en la dominancia de los grupos taxonómicos debido al cultivo de la piña, la ocurrencia de algunos géneros que podrían ser utilizados como indicadores de perturbaciones del suelo, y la información dada por los índices de la comunidad de nematodos, son datos que merecen mayor atención.

La variabilidad sugiere características heterogéneas del suelo, principalmente materia orgánica, pero también otras propiedades como el contenido de agua y el pH del suelo, que pueden influir en las comunidades de nematodos (Simon et al., 2018; Quist et al., 2019; Liu et al., 2019). El análisis RDA en este estudio respalda esta afirmación. Los estudios de comunidades de nematodos deben considerar las propiedades del suelo de los lugares donde habitan, especialmente en áreas tropicales, donde los microhábitats son frecuentes debido a la heterogeneidad y particularidades del ambiente.

Por otro lado, y referente al manejo del suelo, muchas de las diferencias se encontraron entre las plantas perennes (bosques y plantaciones de árboles) y las plantaciones de piña, con una sola excepción: la abundancia de *Aporcelinus*, que difirió entre la piña convencional y la piña

bajo mínima labranza o materia orgánica, esto indica que, en algunos casos o combinados con otras prácticas, la labranza mínima y la adición de materia orgánica podrían promover un suelo más estructurado. Se ha demostrado que ambas prácticas, y especialmente la no labranza, influyen en las comunidades de nematodos (Bongiorno et al., 2019; Neher et al., 2019; Su et al., 2021).

En cuanto a la abundancia, diversidad y distribución, la mayoría de las diferencias estadísticas se encontraron a nivel de género, lo que revela la importancia de un mayor conocimiento sobre los géneros y especies presentes en las regiones tropicales para determinar cuáles podrían usarse como indicadores o pueden estar asociados con ciertos ambientes, cultivos, o prácticas agrícolas. Se deben realizar más estudios sobre los géneros: *Discocricionemella*, *Aporcelinus*, *Longidorus*, *Xiphinema*, *Coomansus*, *Aphanolaimus* y *Diphtherophora* para evaluar su potencial como indicadores ambientales. Además, un análisis en profundidad de las especies del género *Helicotylenchus* debe llevarse a cabo para afirmar la diversidad de especies y las funciones ecológicas estudiadas a nivel de especie.

## 8 Recomendaciones

- Trabajar con reactivos lo más nuevos posibles, para evitar problemas de calidad en las preparaciones de las muestras de ADN.
- Desarrollar más estudios específicos sobre el efecto de prácticas agronómicas en la abundancia y diversidad de nematodos y comunidades microbianas.
- Para mejorar la estimación de los posibles efectos de las técnicas de manejo del suelo, es necesario dar seguimiento al estudio con varios muestreos en el tiempo.
- Se deben establecer protocolos estrictos para la colecta, transporte, almacenaje y manipulación, para evitar posible contaminación.

## 9 Referencias

- Acuña-González, G. (2009). La actividad piñera en Costa Rica: De la producción a la expansión Principales características, impactos, retos y desafíos. DITSO. Rosa Luxemburg Stiftung ,32pp
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

- Becklund, K., Powers, J., & Kinkel, L. (2016). Tree species effects on pathogen-suppressive capacities of soil bacteria across two tropical dry forests in Costa Rica. *Oecologia*, 182(3), 789-802.
- Bertsch, F. & Henríquez, C. (2015). 2015: El Año Internacional de los Suelos. *Agronomía Costarricense*, 39(3), 149-155.
- Bisseling, T., Dangl, J. L., & Schulze-Lefert, P. (2009). Next-generation communication. *Science* 324, 691. DOI: 10.1126/science.1174404
- Boag, B., & Yeates, G. W. (1998). Soil nematode biodiversity in terrestrial ecosystems. *Biodiversity & Conservation*, 7(5), 617-630.
- Bolger, A.M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120. Doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Bongers, T. (1990). The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83(1), 14–19. <https://doi.org/10.1007/BF00324627>.
- Bongers, T., & Bongers, M. (1998). Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, 10(3), 239–251. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00123-1).
- Bongiorno, G., Bodenhausen, N., Bünemann, E. K., Brussaard, L., Geisen, S., Mäder, P., Quist, C. W., Walser, J.-C., & Goede, R. G. M. de. (2019). Reduced tillage, but not organic matter input, increased nematode diversity and food web stability in European long-term field experiments. *Molecular Ecology*, 28(22), 4987–5005. <https://doi.org/10.1111/MEC.15270>.
- Bowker, M. A., Maestre, F. T. & Escobar, C. (2010). Biological crusts as a model system for examining the biodiversity–ecosystem function relationship in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(3), 405-417.
- 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: 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., & Holmes, S.P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11: 2639-2643. <https://doi.org/10.1030/ismej.2017.119>.
- Campbell BJ. (2014). The Family Acidobacteriaceae. *In: The Prokaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea* (4<sup>th</sup> Ed.). Rosenberg E, DeLong EF, Stackebrandt E & Thompson F. (Eds). Springer, 405-414pp. DOI 10.1007/978-3-642-38954-2.
- Carney, K. M., & Matson, P. A. (2006). The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microbial Ecology*, 52(2), 226-238.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K. *et al.* (2010b). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Natural Methods* 7: 335–336.
- Coolen, W. A. (1979). Methods for extraction of *Meloidogyne* spp. In F. Lamberti & C. E. Taylor (Eds.), *Root-knot nematodes (Meloidogyne species); systematics, biology and control* (pp. 317–329). Academic Press Inc.
- Cleveland, C. C., Townsend, A. R., Schmidt, S. K., & Constance, B. C. (2003). Soil microbial dynamics and biogeochemistry in tropical forests and pastures, southwestern Costa Rica. *Ecological Applications*, 13(2), 314-326.
- Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227-243.
- Eaton, W. D., & Chassot, O. (2012). Characterization of soil ecosystems in Costa Rica using microbial community metrics. *Tropical Ecology*, 53(2), 185-195.
- Echeverria-Beirute, F., Varela-Benavides, I., Jiménez-Madriral, J.P., Carvajal-Chacón, M. & Guzman-Hernandez, T. (2021). EDNA extraction protocol for metagenomic studies in tropical soils. *BioTechniques*, 71(6): 581-586. 10.21144/btn-2021-0057.
- Faith DP. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61: 1-10.
- Ferris, H. (2010). Form and function: Metabolic footprints of nematodes in the soil food web. *European Journal of Soil Biology*, 46(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.01.003>
- Ferris, H., Bongers, T., & de Goede, R. G. M. (2001). A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*, 18(1), 13–29. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00152-4)

- Hashmi I, Bindschedler S & Junier P. (2020). Chapter 18 – Firmicutes. *In: Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Editor(s): Amaresan N, Kumar MS, Annapurna K, Kumar K, Sankaranarayanan A. (Ed). Academic Press, Pages 363-396, ISBN 9780128234143, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00018-6>.
- Liu, T., Hu, F., & Li, H. (2019). Spatial ecology of soil nematodes: Perspectives from global to micro scales. *Soil Biology and Biochemistry*, 137, 107565. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2019.107565>.
- Lopes, L.D. & fernandes, M.F. (2020). Changes in microbial community structure and physiological profile in a kaolinitic tropical soil under different conservation agricultural practices. *Applied Soil Ecology*, 152: 103545. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103545>.
- Love MI, Huber W & Anders S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lozupone C & Knight R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 71(12): 8228-8235.
- Martinez-Lopez C, Rivera Paja AO, Menjivar Flores JC. (2021). Susceptibility to erosion risks in soils dedicated to pineapple cultivation in the department of Valle del Cauca, Colombia. *Earth Sci. Res. J.*, 25(2): 201-206. <https://doi.org/10.15446/esrj.v25n2.84601>
- Neher, D. A., Nishanthan, T., Grabau, Z. J., & Chen, S. Y. (2019). Crop rotation and tillage affect nematode communities more than biocides in monoculture soybean. *Applied Soil Ecology*, 140, 89–97. <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2019.03.016>.
- Oostenbrink, M. (1960). Estimating nematode populations by some selected methods. In J. N. Sasser & W. R. Jenkins (Eds.), *Nematology*. Chaper Hill: University of North Carolina Press.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.*, 41(D1): D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Quist, C. W., Gort, G., Mooijman, P., Brus, D. J., van den Elsen, S., Kostenko, O., Vervoort, M., Bakker, J., van der Putten, W. H., & Helder, J. (2019). Spatial distribution of soil nematodes relates to soil organic matter and life strategy. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 107542. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2019.107542>.

- Seinhorst, J. W. (1966). Killing nematodes for taxonomic study with hot f.a. 4 : 1. *Nematologica*, 12(1), 178–178a. <https://doi.org/10.1163/187529266X00239>.
- Shannon CE & Weaver W. (1949). The mathematical theory of communication. *University of Illinois Press*, Champaign, Illinois.
- Sherman LA & Brye KR. (2019). Soil Chemical Property Changes in Response to Long-Term Pineapple Cultivation in Costa Rica. *Agrosyst. Geosci. Environ.*, 2:190052. <https://doi.org/10.2134/age2019.07.0052>
- Sieriebriennikov, B., Ferris, H., & de Goede, R. G. M. (2014). NINJA: An automated calculation system for nematode-based biological monitoring. *European Journal of Soil Biology*, 61, 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.02.004>.
- Sorenson T. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab* 5.1-34: 4-7.
- Wei, Z. & Jousset, A. (2017). Plan Breeding Goes Microbial. *Trends in Plant Science*, 22(7): 555-558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plants.2017.05.009>
- FAO. (s.f.). 2015 Año Internacional de los Suelos. Suelos sanos para una vida sana. <http://www.fao.org/soils-2015/es/>. Consultado 5 febrero 2018
- Ferris, H., Pocasangre, L. E., Serrano, E., Muñoz, J., Garcia, S., Perichi, G., & Martinez, G. (2012). Diversity and complexity complement apparent competition: nematode assemblages in banana plantations. *Acta oecologica*, 40, 11-18
- Ferris, H., & Tuomisto, H. (2015). Unearthing the role of biological diversity in soil health. *Soil Biology and Biochemistry*, 85, 101-109.
- Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen, U. N., Bates, S. T., Lauber, C. L., Owens, S., Gilbert, J. A., Wall, D. A. & Caporaso, J. G. (2012). Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52), 21390-21395.
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, W., Zhang, T., Chen, H., & Mo, J. (2015). Effects of nitrogen and phosphorus additions on soil microbial biomass and community structure in two reforested tropical forests. *Scientific reports*, 5, 14378.
- Looby, C. I., & Treseder, K. K. (2018). Shifts in soil fungi and extracellular enzyme activity with simulated climate change in a tropical montane cloud forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 117, 87-96.

- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., & Colón-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of experimental botany*, 60(6), 1729-1742.
- Palomares-Rius, J. E., Castillo, P., Montes-Borrego, M., Müller, H., & Landa, B. B. (2012). Nematode community populations in the rhizosphere of cultivated olive differs according to the plant genotype. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 168-171.
- Porazinska, D. L., Morgan, M. J., Gaspar, J. M., Court, L. N., Hardy, C. M., & Hodda, M. (2014). Discrimination of plant-parasitic nematodes from complex soil communities using ecometagenetics. *Phytopathology*, 104(7), 749-761.
- Powers, T. O., Neher, D. A., Mullin, P., Esquivel, A., Giblin-Davis, R. M., Kanzaki, N., Stock S. P. Mora, M. M. & Uribe-Lorio, L. (2009). Tropical nematode diversity: vertical stratification of nematode communities in a Costa Rican humid lowland rainforest. *Molecular ecology*, 18(5), 985-996.
- Rodríguez, A., Rojas, M., & Pocasangre, L. E. (2011). Evaluación de nematodos de vida libre como indicadores de calidad y salud de suelos en tres sistemas de producción de banano. *Tierra Tropical*. 8(1):115-125
- Shen, Z., Penton, C. R., Lv, N., Xue, C., Yuan, X., Ruan, Y., Rong, L. & Shen, Q. (2017). Banana Fusarium wilt disease incidence is influenced by shifts of soil microbial communities under different monoculture spans. *Microbial ecology*, 1-12.
- Sieriebriennikov, B., Ferris, H., & de Goede, R. G. M. (2014). NINJA: An automated calculation system for nematode-based biological monitoring. *European Journal of Soil Biology*, 61, 90-93.
- Steel, H., & Ferris, H. (2016). Soil nematode assemblages indicate the potential for biological regulation of pest species. *Acta oecologica*, 73, 87-96.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J. L & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3), 562.

- Van Der Heijden, M. G., 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.
- Wang Z, Liu L, Chen Q, et al. (2016). Conservation tillage increases soil bacterial diversity in the dryland of northern China. *Agron. Sustain. Dev.*, 36: 28.  
<https://doi.org/10.1007/s13593-016-0366-x>
- Zamioudis, C. & Pieterse, C.M.J. (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 139–150
- Zhang L & Xu Z. (2008). Assessing bacterial diversity in soil. *J. Soils Sediments*, 8:379-388. <https://doi.org/10.1007/s11368-008-0043-z>