

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**De Vuelta a las Raíces: Descifrando la diversidad taxonómica
y funcional del microbioma de la raíz del tomate nativo y
moderno de los Andes ecuatorianos**

Pamela Nicole Chanco Espinosa

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

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

De Vuelta a las Raíces: Descifrando la diversidad taxonómica y funcional del microbioma de la raíz del tomate nativo y moderno de los Andes ecuatorianos

Pamela Nicole Chanco Espinosa

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van 't Hof, Ph.D.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Pamela Nicole Chanco Espinosa

Código: 00125840

Cédula de identidad: 1720472610

Lugar y fecha: Quito, 4 de mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

Las plantas están colonizadas por una alta cantidad de microorganismos, que revelan una relación íntima entre los microorganismos y su huésped. Sin embargo, la domesticación eventualmente provocó que las plantas silvestres con gran diversidad microbiana en la raíz y potencial de resistencia a estrés biótico y abiótico se debilitaran. Con esto se formuló la hipótesis de que los cultivos modernos probablemente perdieron su capacidad de comunicación con su microbiota benéfica de la rizosfera.

El presente estudio tiene como objetivo investigar a nivel fenotípico y molecular la diversidad taxonómica y funcional de los microbiomas de la raíz, que establecen asociaciones benéficas con tomates nativos *Solanum pimpinellifolium* y tomates domesticados *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker. Esto se realizó en una serie de experimentos de invernadero en condiciones controladas, cultivando ambos tipos de tomate en suelos nativos y modernos de los Andes ecuatorianos. Además, se empleó técnicas de microbiología y moleculares para la extracción del ADN rizosférico y, para la secuenciación se usó los genes 16S ARNr. Para procesar la información de la secuenciación se usó DADA2 y R (phyloseq package).

Se encontró que existe un mejor rendimiento del tomate nativo *Solanum pimpinellifolium* en el suelo nativo de Loja, aunque este presentó deficiencias nutricionales en el análisis fisicoquímico de suelo. Es probable que, al ser este suelo hábitat natural del este tomate, contenga los microorganismos benéficos con los que la planta coevolucionó y estableció una relación íntima que impulsó el desarrollo del tomate nativo. En conclusión, se evidenció que existe un mejor rendimiento del tomate nativo en suelos nativos y con los resultados de la secuenciación se espera encontrar una comunidad microbiana benéfica asociada a tomates nativos y domesticados.

Esta clase de investigaciones se desarrollan en beneficio de una agricultura sostenible y sustentable.

Palabras clave: Microbioma de tomate, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*, rizosfera, Andes ecuatorianos, Taxonomía bacterial, 16S ARNr.

ABSTRACT

Plants are colonized by a high number of microorganisms, which reveal an intimate relationship between the microorganisms and their host. However, domestication from native ancestral tomatoes with a high microbial diversity associated to their roots and a high resistance to biotic and abiotic stress, resulted in modern, high producing tomatoes which depend on anthropogenic nutrition and protection. It is therefore assumed that modern crops nowadays are less able to communicate with their beneficial rhizosphere microbiota.

The objective of this study is to investigate the phenotypic response of the host plant and the taxonomic and functional diversity of root microbiomes of the native tomato *Solanum pimpinellifolium* and the domesticated tomato *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. A series of greenhouse experiments under controlled conditions were performed, by growing both types of tomato in modern and native soils of the Ecuadorian Andes. In addition, molecular techniques were used to sequence the 16S rRNA region of the tomato rhizosphere. Sequencing data will be processed using the bioinformatic pipelines in DADA2 and R (phyloseq package).

Results showed a better performance of the native tomato *Solanum pimpinellifolium* in the native soil of Loja, even though this soil presented nutritional deficiencies in the physical-chemical soil analysis. It is likely that, as this soil is the natural habitat of native tomatoes, it contains the beneficial microorganisms with which the plant coevolved and established an intimate relationship, which was responsible for the development of the native tomato in this soil. With the upcoming results of the sequencing phase, it is expected to explore the beneficial microbial community associated with the roots of native and domesticated tomatoes.

This study is part of a better understanding of the interaction of microorganisms and plants to determine how beneficial microorganisms as inhabitants of native soils could be of benefit to a more sustainable agriculture in the future.

Key words: Tomato microbiome, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*, rhizosphere, Ecuadorian Andes, bacterial taxonomy, 16S rRNA.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Microbioma vegetal.....	11
1.2. Importancia del estudio del microbioma de plantas	12
1.3. ¿Cómo estudiar el microbioma?	13
1.4. Impacto de la domesticación en el microbioma.....	15
1.5. Generalidades del tomate	16
1.6. Justificación del estudio	17
2. MÉTODOS	19
2.1. Descripción, colecta y preparación de suelos	19
2.2. Tipos de tomate, condiciones de invernadero, siembra y riego	19
2.3. Evaluación de parámetros, registro de mediciones y colecta de muestras .	20
2.4. Diseño experimental y análisis estadístico	20
2.4.1. Experimento 1: Evaluación fenotípica de tomates modernos en suelos nativos de Calacalí y Cayambe.	20
2.4.2. Experimento 2: Evaluación fenotípica de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos de Calacalí y Cayambe.	21
2.4.3. Experimento 3: Evaluación fenotípica de tomates nativos <i>S. pimpinellifolium</i> y modernos <i>S. lycopersicum</i> cv. Moneymaker en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.....	21
2.5. Experimento 3	22
2.5.1. Análisis físico, químico y biológico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja	22
2.5.2. Extracción de ADN total de las rizosferas de tomates nativos y tomates modernos.	23
2.5.3. Secuenciación de los microbiomas de las rizosferas de tomates nativos y modernos y análisis bioinformático.	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. Experimento 1: Evaluación fenotípica de tomates modernos cultivados en suelos nativos de Calacalí y Cayambe.	24
3.1.1. Altura de tomates modernos en suelos nativos.....	24
3.1.2. Peso seco foliar de tomates modernos en suelos nativos.....	24
3.1.3. Respuesta fenotípica en los suelos tratados (autoclavados) de Cayambe y Calacalí.....	25
3.2. Experimento 2: Evaluación fenotípica de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos de Calacalí y Cayambe	25
3.2.1. Altura de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos.....	25
3.2.2. Peso seco foliar de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos.	26
3.3. Experimento 3: Evaluación fenotípica de tomates nativos <i>S. pimpinellifolium</i> y modernos <i>S. lycopersicum</i> cv. Moneymaker en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.....	26

3.3.1.	Altura de tomate moderno y nativo en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.....	26
3.3.2.	Peso seco foliar de tomates modernos variedad Moneymaker en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.	27
3.3.3.	Peso seco foliar de tomates nativos <i>S. pimpinellifolium</i> en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.....	28
3.4.	Resultados de los análisis químico, biológico y físico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.	28
3.4.1.	Análisis químico y biológico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.....	28
3.4.2.	Análisis físico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.....	29
3.5.	Posibles resultados de la secuenciación de los microbiomas de las rizosferas de tomates modernos y nativos en suelos modernos y nativos de Cayambe y Loja.....	30
4.	DISCUSIÓN.....	31
5.	CONCLUSIONES.....	38
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
7.	ANEXO A: TABLAS.....	45
8.	ANEXO B: FIGURAS.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Áreas de colecta de suelos nativos y modernos.....	45
Tabla 2. Tipo de tomate moderno, nativo y criollo	45
Tabla 3. Diseño experimental del experimento 3	45
Tabla 4. Análisis químico y biológico de los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.....	46
Tabla 5. Análisis físico de los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Ecuador de las áreas de colecta de suelos nativos y modernos.....	47
Figura 2. Altura (a) y peso seco foliar (b) de tomates modernos <i>S. lycopersicum</i> cv. Cherry (izquierda) y cv. Pomodoro (derecho) en suelos nativos de Calacalí y Cayambe no tratados y autoclavados.....	48
Figura 3. Altura (a) y peso seco foliar (b) de tomates modernos <i>S. lycopersicum</i> cv. Floradade y cv. Pomodoro, tomate criollo <i>S. lycopersicum</i> cv. Cerasiforme y tomate nativo <i>S. pimpinellifolium</i> en suelos nativos de Calacalí y Cayambe	49
Figura 4. Altura de tomates de acuerdo con el sitio Cayambe y Loja y tipo de suelo moderno y nativo.....	50
Figura 5. Peso seco foliar de tomates modernos <i>S. lycopersicum</i> cv. Moneymaker de la fase de intercambio con previa fase de activación con <i>S. lycopersicum</i> cv. Moneymaker y <i>S. pimpinellifolium</i> en suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja (a). Peso seco foliar de tomates nativos <i>S. pimpinellifolium</i> de la fase de intercambio con previa fase de activación con <i>S. pimpinellifolium</i> y <i>S. lycopersicum</i> cv. Moneymaker en suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja (b).....	51
Figura 6. Filos de procariotas del análisis con el gen 16S (a) y filios de eucariotas del análisis con el gen 18S (b) del microbioma de la rizosfera de tomate moderno de un estudio hecho en la región de Guasave, México (Cordero et al., 2012).....	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microbioma vegetal

La transferencia de microorganismos a la planta huésped sucede de forma vertical por medio de los padres y horizontal por medio del medio ambiente (Cordovez et al., 2019). En una planta todos sus tejidos se encuentran colonizados por comunidades microbianas, debido a que los microbios tienden a moverse entre la filosfera, la endosfera y la rizosfera (Turner et al., 2013). Es por esto, que el ensamblaje del microbioma implica variaciones muy dinámicas en la composición y abundancia de especies (Cordovez et al., 2019).

Para fines de este estudio la composición de la rizosfera será el centro de interés, debido a que es una zona de alta diversidad microbiana, que en gran medida proviene del suelo y es influenciada por los exudados de las raíces, células desprendidas y depósitos de mucílago vegetal. Los exudados de la raíz se caracterizan por ser determinantes de la estructura del microbioma de la rizosfera y su composición puede variar entre especies de plantas, edad y etapas de desarrollo. (Turner et al., 2013). Un estudio muestra que ciertas accesiones de *A. thaliana* presenta divergentes composiciones de exudado y como resultado distintas comunidades bacterianas en la rizosfera (Cordovez et al., 2019).

Por otro lado, están las células desprendidas y los depósitos de mucílago que proporcionan una alta cantidad de materia a la rizosfera como la pectina y la celulosa. La pectina al descomponerse produce metanol y este a su vez es empleado por los microorganismos como fuente de carbono. Por su parte, la degradación de la celulosa muestra la acción de los microorganismos que residen en suelos con alta cantidad de materia orgánica (Turner et al., 2013).

En estudios de microbiomas de rizosfera indican que las Proteobacterias de las clases α y β son las más dominantes junto con otros grupos como Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia y Acidobacteria. También, están las

rizobacterias que intervienen en desarrollo de la planta por diferentes mecanismos. Están las bacterias fijadoras de nitrógeno, que junto a las de vida libre (*Azotobacter spp.*) y las simbióticas (*Rhizobium spp.*) brindan una fuente de nitrógeno fija para la planta, además que muchas de ellas solubilizan el fósforo de manera que incrementan su biodisponibilidad. Además, las rizobacterias también intervienen en el desarrollo de las plantas de una manera antagónica contra patógenos al generar antimicrobianos e interferir con factores de virulencia por medio de efectores suministrado por sistemas de secreción tipo 3 (Turner et al., 2013).

Por otro lado, están los actinomicetos que son los más cuantiosos en el suelo y las rizosferas. Se conoce que estos producen compuestos con características antivirales, antibacterianas, antifúngicas, nematocidas e insecticidas que protegen a la planta (Turner et al., 2013). En general, los microorganismos de la rizosfera tienen la capacidad de instaurar asociaciones neutrales, benéficas o perjudiciales con su huésped. Una microbiota abundante y diversa puede ser una potencial arma para prevenir infecciones o enfermedades. Sin embargo, el hecho de que no se ha definido todo el microbioma presente en una planta, limita el conocimiento del aporte de este a su fenotipo (Cordovez et al., 2019).

1.2.Importancia del estudio del microbioma de plantas

Los microorganismos son esenciales para el mantenimiento de la vida en el planeta Tierra puesto que estos integran la más grande agrupación de seres vivos que habitan en varios nichos que van desde la atmósfera, el suelo, las masas de agua y los entornos fuera y dentro de organismos multicelulares (Burton et al., s.f.). Técnicas basadas en cultivos han permitido su aislamiento y estudio, así como también técnicas moleculares, como la metagenómica han permitido su identificación *in situ*. El estudio del microbioma se centra

en la investigación de estas asociaciones de microorganismos con la finalidad de conocer la diversidad de especies presentes, así como la información codificada en sus genes y por su puesto su función ecológica (Turner et al., 2013).

Dentro de este contexto es imprescindible definir qué es un microbioma. Este término hace referencia al genoma (conjunto de genes) de todos los microorganismos, simbióticos y patógenos que habitan en un ambiente en particular, generalmente anclado al del ser humano. Sin embargo, esto último varió porque que el microbioma también se asocia a animales y plantas (Merriam-Webster, s.f.). En este estudio, se explorará exclusivamente el microbioma vegetal, el cual es un determinante importante en la salud y productividad de la planta (Turner et al., 2013).

Un ejemplo de la trascendencia de las interacciones microbio-planta son los hongos micorrícicos, que de acuerdo con evidencia molecular sus asociaciones con algas verdes fueron precisas para la evolución de plantas terrestres hace 700 millones de años. En su mayoría, las plantas han conservado esta simbiosis para absorber minerales como el fósforo por medio de la raíz. Por esto, el estudio del microbioma puede ayudar a comprender la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas asociadas a las plantas y cómo sus asociaciones influyen en sus rasgos y salud (Turner et al., 2013).

1.3.¿Cómo estudiar el microbioma?

El aislamiento y cultivo de microorganismos de un entorno con el uso de medios nutrientes y condiciones de crecimiento, apropiadas para un microorganismo en específico son técnicas comunes la microbiología clásica. Y a pesar de que son muy necesarias para investigaciones de fisiología y genética, técnicas basadas en cultivos tienen la desventaja de perder una gran cantidad de la diversidad de microorganismos presentes en un ambiente (Cordovez et al., 2019). Es por ello, que la actualidad se

emplean técnicas moleculares que no dependen de cultivos y que permiten identificar a los microorganismos gracias a la metagenómica (Suárez, 2017).

Los microorganismos se encuentran en comunidades y constantemente interactúan unos con otros y también con sus huéspedes. Por esto, es indispensable hacer estudios globales como la metagenómica que permiten analizar y hacer comparaciones simultáneas de diferentes poblaciones de microorganismos en los dominios de la vida. La metagenómica permite conocer la funcionalidad de un microbioma, es decir, la abundancia de genes presentes en determinados procesos metabólicos (Cordovez et al., 2019).

La identificación del microbioma de una muestra biológica parte de la extracción del ADN, la amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S (ARNr) presente en organismos procariotas. Esta subunidad es una diana universal para identificación de bacterias, ya que ayuda en la caracterización taxonómica desde dominio hasta especie en ocasiones. En el caso, de hongos se emplea la subunidad 18S (ARNr), aunque a veces no proporciona una gran discriminación taxonómica (Ghosh et al, 2019)

Actualmente, se emplean con mayor frecuencia los secuenciadores de segunda generación, por el hecho de que son de alto rendimiento y se caracterizan por producir miles de secuencias en un tiempo muy corto y a costos muy bajos. Existen cuatro plataformas para llevar a cabo la secuenciación. En este caso, se hablará de la plataforma Illumina que se basa en la polimerización del ADN, donde se incluye un nucleótido cubierto en la cadena naciente para evitar que esta crezca y que está marcado con fluorescencia. Una vez que se identifica la fluorescencia se descarta la protección y se incluye nuevamente otro nucleótido marcado para que otro ciclo inicie (Vázquez, 2016).

Una plataforma de secuenciación produce masivamente millones de datos que deben ser procesados por softwares especializados que los convierten en información biológica significativa y DADA2 es uno de esos programas (Prodan et al, 2020). Este infiere variantes de secuencia de amplicones exactas (ASVs por sus siglas en inglés) de datos de secuenciación de ampliación de alto rendimiento. DADA2 parte de archivos Fastq demultiplexados, elimina errores de sustitución y quimera, y produce variantes de secuencias y sus abundancias. Además, establece la clasificación taxonómica por medio de un clasificador bayesiano ingenuo RPD (Callahan et al., 2016)

1.4. Impacto de la domesticación en el microbioma

La domesticación de plantas fue producto de una revolución agrícola que buscó proveer alimentos con mayor continuidad a los primeros cazadores y recolectores humanos que fueron también los promotores de asentamientos estables. Este proceso conllevó variaciones progresivas en el hábitat de los cultivos, el uso desmedido de pesticidas y fertilizantes para generar mejores rendimientos y proveer mayor protección a los cultivos de estrés biótico y abiótico. Es probable que el cambio de hábitats nativos a suelos agrícolas haya generado el agotamiento de los microorganismos y así como sus funciones benéficas co-evolucionadas (Cordovez et al., 2019).

Algunos estudios revelan distinciones entre ancestros, variedades locales y genotipos modernos para mantener una simbiosis con micorrizas y rizobios fijadores de nitrógeno. Por ejemplo, habas y guisantes presentaron una menor capacidad de relacionarse con simbiontes que sus parientes silvestres. Otro ejemplo, es la fertilización nitrogenada que en un largo período resultó en la evolución de rizobios menos mutualistas, junto con una respiración inhibida del suelo y la biomasa microbiana. En otro escenario, también se observó afección en la ocurrencia de Bacteroidetes, caracterizados por su función de

degradabilidad de materia orgánica compleja, causada por prácticas agrícolas (Cordovez et al., 2019).

En términos generales, las plantas dependen de su microbiota para su ensamblaje y funciones vitales. Sin embargo, la domesticación pudo haber afectado negativamente esta composición microbiana socavando sus efectos benéficos en el desarrollo y salud de la planta (Pérez-Jaramillo et al., 2018). Por este motivo, las plantas silvestres en sus hábitats nativos se estudian para identificar rasgos vegetales y microbianos con la capacidad de descifrar mecanismos inmersos en la construcción del microbioma y a su vez introducir a futuro el estudio del microbioma con un método de fitomejoramiento (Cordovez et al., 2019).

1.5.Generalidades del tomate

El tomate moderno (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia *Solanaceae* con aproximadamente 3000 miembros (Sánchez, 2017). Es una planta herbácea perenne y dicotiledónea. Su tallo es grueso y verde, sus hojas son compuestas y pinnadas, su flor es regular y perfecta, su fruto es una baya bilocular y subesférica. Su desarrollo óptimo se encuentra a una temperatura entre 20 a 30°C en el día y en la noche entre 10 y 17°C, pero depende del tipo o variedad del tomate. A una humedad relativa entre 60% y 80%, a una altura de 1000 y 2000 m.s.n.m. y en un suelo de textura media, con un pH de 5,0 a 6,8 (López, 2016). Tiene su origen en los Andes de Colombia, Perú, Bolivia, Chile y Ecuador incluidas las Islas Galápagos. Su sitio de domesticación no se conoce totalmente, pero es posible que haya sido en México, Europa o Asia (Sánchez, 2017).

Es la segunda de las cinco hortalizas más importantes económicamente en el mundo por las grandes extensiones de terreno que se consignan a su cultivo. Además, de sus propiedades y utilidades como ser fuente de licopeno, β -caroteno, vitamina C y su extenso

uso en la industria de alimentos. Su producción aumenta a la par que crece la población humana (Sánchez, 2017). Al momento China es el país que ocupa el primer lugar en el top 20 de países productores de tomates al año con 61,523,462 ton (toneladas). Después está India con 19,377,000 ton, Estados Unidos con 12,612,139 ton y en Sudamérica Brasil con 4,110,242 ton (FAOSTAT, 2018). Fuera del top 20 está Ecuador donde se registró una producción de 31,891 ton y un área de cosecha de 1547 ha (hectáreas) (FAOSTAT, 2018). Además, en Ecuador el tomate es gravemente afectado por larvas de la liendrilla (*Prodidiplosis longifila*) que marchitan la planta y genera cuantiosas pérdidas (Valarezo et al., 2003).

Solanum lycopersicum y gran parte de sus variedades se caracterizan por presentar un mismo desempeño de susceptibilidad a diferentes clases de estrés. Además, presenta muy poca variabilidad por lo que resulta importante estudiar especies nativas como *Solanum pimpinellifolium*, que en una sola accesión presentan una amplia variedad genética y resistencia a condiciones de estrés que probablemente puede ser por su microbioma (Chang, 2016). Esta especie cuyo rango natural incluye ambientes en el norte del bosque tropical ecuatoriano y el desierto costero peruano, se lo encuentra en zonas no perturbadas y en poblaciones bastante densas y a pesar de que, casi no se cosecha para consumo humano, se usa como fuente de germoplasma para mejoradores de tomate (Zuriaga et al, 2009).

1.6. Justificación del estudio

Uno de los retos a los que se enfrenta el mundo, es alimentar a una población creciente que para el 2050 tendrá aproximadamente 9,73 mil millones de habitantes. La producción de alimentos entre 2007 a 2050 debe incrementar en un 70% mientras se practica una agricultura sostenible y sustentable (FAO, 2017). De allí surge la idea de que los futuros

aumentos en los rendimientos agrícolas tendrán que lograrse con un aporte reducido de fertilizantes y pesticidas y, con frecuencia, en suelos degradados. Estos desafíos han aumentado la importancia de las decenas de millones de microorganismos que viven en asociación con las raíces de las plantas y que estimular el desarrollo y salud de sus huéspedes (Orcutt, 2016).

Por ello, se propone la iniciativa “De vuelta a las raíces” (Back to the Roots por sus siglas en inglés), un estudio del microbioma rizosférico de tomate nativo y moderno cultivados en suelos nativos y modernos de los Andes Ecuatorianos. Este estudio tiene como fin descifrar la biodiversidad de microorganismos asociados a las raíces de tomates nativos y modernos que forman asociaciones benéficas con el tomate para estimular su crecimiento y resistencia a estrés biótico y abiótico. Para esto se realizó experimentos de invernadero y se utilizó las revoluciones en genómica que permitirán explorar lo que acontece en la composición y funcionalidad del microbioma rizosférico y así identificar las comunidades microbianas benéficas para reinsertarlas en tomates modernos y contribuir a obtener altos rendimientos de los cultivos con la característica de resistencia a estrés y con el menor aporte de fertilizantes y pesticidas.

2. MÉTODOS

2.1. Descripción, colecta y preparación de suelos

Para la colecta de los suelos se realizaron salidas de campo a Zapotillo (Loja) y a Cayambe y Calacalí (Pichincha). En Loja, se colectó suelo nativo, donde se reportó que crecen tomates nativos naturalmente (*Solanum pimpinellifolium*) (Morales et al., 2014). En el caso de Cayambe el suelo nativo se colectó de zonas boscosas no perturbadas; es un suelo que naturalmente suprime enfermedades. En Calacalí, se colectó un suelo nativo, igual de zonas boscosas naturales. Adicionalmente, en la proximidad de los sitios de colecta de los suelos nativos de Zapotillo y Cayambe, se colectó suelo moderno, donde se cultivan tomates y papas (familia *Solanaceae*) como producto de la agricultura local con fertilizantes artificiales y pesticidas químicos (**Figura 1** y en **Tabla 1**). En cada coordenada se colectó 50 kg suelo y se lo transportó al invernadero de la USFQ. Cada tipo de suelo atravesó una preparación donde se secó al aire libre durante 7 días. Después, se lo tamizó en una malla de 2 mm para colocarlo en las macetas en una cantidad de 350 gr de suelo humedecido (10% p/v). Además, de cada tipo de suelo se apartó una cantidad para el tratamiento denominado *bulk soil*, es decir, macetas que solo contuvieron suelo sin plantas cultivadas; también llamado suelo no rizosférico.

2.2. Tipos de tomate, condiciones de invernadero, siembra y riego

Para el desarrollo de los experimentos se eligieron varios tipos de tomates modernos, que son el producto de la domesticación. Como tomate nativo, se eligió *Solanum pimpinellifolium* que se caracteriza por crecer de forma silvestre en un ambiente natural sin la intervención del hombre. Como tomate criollo, o intermedio entre el tomate nativo y los tomates modernos, se escogió a *Solanum lycopersicum* cv. Cerasiforme (**Tabla 2**). Los experimentos se ejecutaron en un invernadero en condiciones controladas con luz natural (12h luz/12h oscuridad). La cámara climática se mantuvo a una temperatura \geq a

22°C. Las semillas de tomate se plantaron en las macetas a una profundidad de 1 cm. Luego, se cubrió las macetas con un plástico transparente para estimular la germinación. Las plántulas emergentes fueron monitoreadas y regadas entre 5 y 25 ml de agua cada 1 o 2 días de acuerdo con la humedad del suelo.

2.3.Evaluación de parámetros, registro de mediciones y colecta de muestras

Se eligió evaluar la altura de las plantas durante su crecimiento en la maceta y el peso seco foliar después de su cosecha. Ambos parámetros se tomaron en cuenta por ser indicativos claves del fenotipo de las plantas, además de que permiten establecer comparaciones de rendimiento y estado entre cultivos de un mismo experimento (FAO, 2001). La medición de la altura de las plantas se realizó con un flexómetro (cm) desde la aparición del primer par de hojas verdaderas. Las siguientes mediciones de la altura se fueron registrando cada dos días hasta la presencia del cuarto par de hojas verdaderas. Después, se procedió a la cosecha, donde la zona foliar de las plantas se colocó en bolsas de papel para ser introducidas en un horno a 65°C y luego registrar el peso de las muestras por medio de una balanza calibrada. Para la extracción del ADN rizosférico del Experimento 3 se realizó la colecta del suelo adherido a las raíces. Una vez que se extrajo la planta de la maceta, se hizo un corte en el cuello de la raíz de las 64 plantas para separar la raíz. Las raíces con suelo fueron colocadas en tubos Falcon de 15 ml y se añadió 4ml de solución *LifeGuard Soil Preservation* para su conservación, de la misma forma se colectó las 16 muestras de *bulk soil*. Todos los tubos fueron almacenados a una temperatura de -20°C para prevenir la desnaturalización del material genético.

2.4.Diseño experimental y análisis estadístico

2.4.1. Experimento 1: Evaluación fenotípica de tomates modernos en suelos nativos de Calacalí y Cayambe.

Se emplearon dos tipos de suelos nativos provenientes de Cayambe y Calacalí con dos variedades de semillas modernas *S. lycopersicum* cv. Pomodoro y cv. Cherry. Para el desarrollo del experimento se utilizó 9 kg del suelo nativo de Cayambe y 9 kg de suelo nativo de Calacalí que fueron autoclavados y la misma cantidad de suelo sin autoclavar, lo que resultó en cuatro suelos diferentes con 8 tratamientos que consistieron en 9 réplicas (plantas) resultando en total 72 plantas. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño bifactorial completamente aleatorizado cuyos factores fueron “suelo” (Cayambe autoclavado y sin autoclavar y Calacalí autoclavado y sin autoclavar) y “tipo de tomate” (Pomodoro y Cherry), con lo cual se hizo un análisis de varianza (ANOVA) basado en las variables “altura” y “peso seco foliar”. Para reducir la variación los datos registrados de ambas variables, estos fueron transformados por logaritmo $\log_{10}(x)$ para el análisis.

2.4.2. Experimento 2: Evaluación fenotípica de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos de Calacalí y Cayambe.

Se emplearon los suelos nativos de Cayambe y Calacalí. Se seleccionaron tomates modernos *S. lycopersicum* cv. Floradade y cv. Pomodoro, tomate criollo *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme y un tomate nativo *S. pimpinellifolium*. Esto resultó en 8 tratamientos que tuvieron 4 réplicas, lo que resulta en un total de 32 plantas. Para el análisis estadístico se utilizó el diseño bifactorial completamente aleatorizado cuyos factores fueron “suelo” (Cayambe y Calacalí) y “tipo de tomate” (cv. Moneymaker, Floradade, Cerasiforme y *S. pimpinellifolium*), con lo que se hizo un análisis de varianza (ANOVA) basado en las variables “altura” y “peso seco foliar”. En este caso no se transformó los datos.

2.4.3. Experimento 3: Evaluación fenotípica de tomates nativos *S. pimpinellifolium* y modernos *S. lycopersicum* cv. Moneymaker en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe

Este experimento involucró dos fases: (1) Activación y (2) Intercambio. En la fase 1 se realizó un proceso de activación de los suelos nativos y modernos de Cayambe y

Loja. Esto consistió en sembrar y crecer durante 5 semanas 32 semillas de tomates nativos (*S. pimpinellifolium*) y 32 semillas de tomates modernos (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) en los suelos mencionados. Este proceso tuvo como fin garantizar la actividad microbiana en los suelos. Por otro lado, la fase 2 de intercambio, consistió en sembrar una mitad de semillas de tomates nativos (*S. pimpinellifolium*) y otra mitad de semillas de tomates modernos (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) en los mismos suelos, donde previamente se activó con las semillas opuestas. Adicional, en este experimento se incluyeron 8 macetas con *bulk soil* de Cayambe y 8 de Loja como controles sin siembra, para comparar el microbioma del suelo con el microbioma de la rizosfera (**Tabla 3**). Para el análisis estadístico se utilizó el diseño trifactorial completamente aleatorizado cuyos factores fueron “sitio” (Cayambe y Loja), “tipo de suelos” (nativo y moderno) y “combinaciones de tipos de tomate”, como MM (Moneymaker/Moneymaker), MP (Moneymaker/*S. pimpinellifolium*), PM (*S. pimpinellifolium*/Moneymaker) y PP (*S. pimpinellifolium*/*S. pimpinellifolium*). Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) basado en las variables “altura” y “peso seco foliar”. Esto resultó en 16 tratamientos que tuvieron 4 réplicas con lo que se obtiene un total de 64 plantas. Para reducir la variación los datos registrados de la variable altura estos fueron transformados con $\log_{10}(x)$ y los datos de la variable peso seco foliar fueron transformados con $\log_{10}(x + 1)$.

2.5.Experimento 3

2.5.1. Análisis físico, químico y biológico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja

Se realizó una evaluación de la composición de los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja a nivel físico, químico y biológico. Los análisis se realizaron en los laboratorios de Eurofins Agro Ecuador. Los análisis físicos abarcaron mediciones de la acidez de los suelos (pH), así como análisis de textura donde se consideró el porcentaje

(%) de carbono orgánico, materia orgánica, arcilla, limo y arena. Para el análisis químico se evaluó la cantidad de macronutrientes en [kg/ha] y micronutrientes en [g/ha] con énfasis en la determinación de la cantidad de nitrógeno, fósforo, potasio, hierro y magnesio. Estos son elementos determinantes para el desarrollo de las comunidades microbianas y para el crecimiento de la planta. Por último, se hizo una evaluación biológica de la cantidad de biomasa microbiana presente en el suelo en [mg C/kg].

2.5.2. Extracción de ADN total de las rizosferas de tomates nativos y tomates modernos.

El ADN total de las muestras de la rizosfera se extrajo por lisis mecánica (con esferas de granate), y para la extracción del ADN total se empleó el método de purificación del ADN con las columnas/filtros del kit *DNeasy PowerSoil (Qiagen, USA)*, a partir de 0,05 g de suelo. La selección de este tipo de kit asegura que los ácidos nucleicos purificados sean de la mayor calidad y cantidad posible para validar que nuestro método de recolección de muestras es adecuado para el análisis propuesto. Para conocer la concentración de ADN total extraído se utilizó el equipo *Nanovue spectrophotometer*.

2.5.3. Secuenciación de los microbiomas de las rizosferas de tomates nativos y modernos y análisis bioinformático.

Para la secuenciación del ADN rizosférico se emplean los genes 16S ARNr (341F y 805R) e ITS (ITS 1 y 2) para identificar y caracterizar las comunidades bacterianas y de hongos, respectivamente. La secuenciación la realiza la empresa Baseclear (Leiden, Países Bajos). Las secuencias de ambos genes se generan en la plataforma MiSeq Illumina y los archivos FASTQ (*.filt.fastq.gz) se analizarán con las herramientas bioinformáticas DADA2 versión 1.12 y R (phyloseq package) versión 1.30.0 para determinar la diversidad taxonómica del microbioma de la rizosfera de tomates nativos y modernos.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1: Evaluación fenotípica de tomates modernos cultivados en suelos nativos de Calacalí y Cayambe.

3.1.1. Altura de tomates modernos en suelos nativos.

El primer parámetro que se midió para poder evaluar la respuesta fenotípica de los suelos modernos *S. lycopersicum* cv. Cherry y *S. lycopersicum* cv. Pomodoro fue la altura de los tomates cultivados en suelos de Cayambe y Calacalí. En la **Figura 2 (a)**, se evidencia que la altura de la planta en la interacción suelo-tomate fue significativamente diferente (ANOVA, $p = 0,016407$) y el promedio ($n = 9$) en la interacción del suelo nativo de Cayambe no tratado con tomate moderno variedad Cherry la altura fue de 1,29 (19,28 cm), mientras que del suelo nativo de Cayambe no tratado con tomate moderno variedad Pomodoro la altura resultó en 1,38 (23,83 cm), los cuales fueron significativamente diferentes. En resumen, tanto la variedad Cherry como la variedad Pomodoro registraron una mayor altura cuando crecieron en suelo de Cayambe no tratado en comparación con el suelo no tratado de Calacalí.

3.1.2. Peso seco foliar de tomates modernos en suelos nativos.

Al final del Experimento 1, se midió también el peso seco de la zona foliar de los tomates en los diferentes tratamientos, para obtener el peso de la biomasa de la parte foliar. En la **Figura 2 (b)**, se observa que el peso seco foliar en la interacción suelo-tomate fue significativamente diferente (ANOVA, $p = 0,016407$) y el promedio ($n = 9$) en la interacción del suelo nativo de Cayambe no tratado con tomate moderno variedad Cherry, el peso seco foliar fue de -1,00 (0,10 g), mientras del suelo nativo de Cayambe no tratado con tomate moderno variedad Pomodoro, el peso seco foliar fue igual a -1,11 (0,08 g). En resumen, se repitieron las observaciones de la altura de los tomates, puesto que se registró un mejor rendimiento de la biomasa para ambas variedades, Cherry y

Pomodoro en el suelo de Cayambe no tratado en comparación con el suelo no tratado de Calacalí.

3.1.3. Respuesta fenotípica en los suelos tratados (autoclavados) de Cayambe y Calacalí.

Cuando se esterilizó el suelo de Cayambe se observó una disminución de la altura y el peso seco foliar en variedades Cherry y Pomodoro (**Figura 2**). La altura se redujo a 1,19 (15,78 cm) y a 1,12 (13,37 cm) y el peso seco foliar disminuyó a -1,10 (0,07 g) y a -1,15 (0,07 g) en Cherry y Pomodoro, respectivamente. Un efecto contrario ocurrió en ambas variedades en el suelo de Calacalí esterilizado, puesto el rendimiento de altura y peso seco foliar incrementó. En el caso de la altura, cambió de 0,92 (8,31 cm) a 1,16 (14,77 cm) en Cherry y de 1,03 (10,75 cm) a 1,14 (13,90) en Pomodoro y el peso seco foliar pasó de 1,82 (0,01 g) a -1,15 (0,06 g) en Cherry y de 1,72 (0,01 g) a -1,40 (0,03 g) en Pomodoro.

3.2. Experimento 2: Evaluación fenotípica de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos de Calacalí y Cayambe

3.2.1. Altura de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos.

Se midió la altura de los tomates para evaluar la respuesta fenotípica de dos tomates modernos *S. lycopersicum* cv. Floradade y cv. Pomodoro, un tomate criollo *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme y un tomate nativo *S. pimpinellifolium* en suelos nativos de Cayambe y Calacalí. **En la Figura 3 (a)**, se observa que la altura de planta en la interacción suelo–tomate fue significativamente diferente (ANOVA, $p = 0,03748$) y el promedio ($n = 4$) en la interacción de suelo nativo de Cayambe con tomate nativo *S. pimpinellifolium* la altura fue de 31,10 cm. Con tomate moderno variedad Floradade fue de 27,62 cm, con tomate moderno variedad Pomodoro fue de 24,42 cm y con tomate

criollo variedad Cerasiforme fue de 20,05. En el caso del suelo nativo de Calacalí todos los tomates presentaron una altura menor en comparación con los mismos tomates que crecieron en el suelo de Cayambe. En resumen, en términos de altura el suelo de Cayambe proporcionó un mejor desarrollo de todos los tomates en contraste con el suelo de Calacalí. Además, es interesante mencionar que el mejor desempeño de altura lo obtuvo el tomate nativo *S. pimpinellifolium* en suelo nativo de Cayambe.

3.2.2. Peso seco foliar de tomates modernos, tomate criollo y tomate nativo en suelos nativos.

Al final del Experimento 2, se midió también el peso seco de la zona foliar de los tomates, para comparar la biomasa de la zona foliar de los tomates modernos con el tomate criollo y nativo. **En la Figura 3 (b)** se observa que el peso seco foliar en la interacción suelo–tomate fue significativamente diferente (ANOVA, $p = 0,01654$) y el promedio ($n = 4$) en la interacción entre el suelo nativo de Cayambe con tomate moderno variedad Floradade fue de 0,28 g, con tomate moderno variedad Pomodoro fue de 0,25 g, con tomate nativo *S. pimpinellifolium* fue de 0,20 g y con tomate criollo variedad Cerasiforme fue de 0,14 g. En el caso del suelo nativo de Calacalí todos los tomates presentaron un menor peso seco foliar en contraste con los mismos tomates que crecieron en el suelo de Cayambe. En resumen, en términos de peso seco foliar el suelo de Cayambe proporcionó un mejor rendimiento para todos los tomates.

3.3.Experimento 3: Evaluación fenotípica de tomates nativos *S. pimpinellifolium* y modernos *S. lycopersicum* cv. Moneymaker en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe

3.3.1. Altura de tomate moderno y nativo en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.

Después de los dos experimentos con suelos nativos de la provincia de Pichincha, investigamos las respuestas fenotípicas del tomate nativo *S. pimpinellifolium* y el tomate

moderno *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, cultivados en un suelo nativo de Loja, donde naturalmente crecen tomates nativos *S. pimpinellifolium*. Para comparar el desempeño de los tomates en los suelos de Loja, se incluyó el suelo nativo de Cayambe, que resultó el mejor suelo en los experimentos previos. En la **Figura 4**, se observa que la altura de la interacción sitio–suelo fue significativamente diferente (ANOVA, $p = 1.42e-07$) y el promedio ($n = 4$) en la interacción de sitio Cayambe con suelo moderno la altura fue de 1,48 (30,12 cm), mientras que del sitio Cayambe con suelo nativo resultó en 1,42 (26,38 cm). En la interacción de sitio Loja con suelo nativo fue de 1,41 (26,02 cm). En el caso, de la interacción de sitio Loja con suelo moderno la altura resultó en 1,08 (11,93 cm). Es decir, se registró una mayor altura de las plantas de tomate que crecieron en suelo de Cayambe moderno y nativo y en suelo de Loja nativo

3.3.2. Peso seco foliar de tomates modernos variedad Moneymaker en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.

En la **Figura 5** se observa que el peso seco foliar en la interacción sitio-suelo-tomate fue significativamente diferente (ANOVA, $p = 0.000546$). Específicamente, en la **Figura 5 (a)** se observa que en los tomates modernos variedad Moneymaker, cuyos suelos se activaron con la misma variedad de tomate Moneymaker, únicamente el suelo moderno de Loja resultó ser diferente de los otros tratamientos con una disminución de su peso a la mitad con 0,03 (0,09 g). Por su parte, los suelos nativos de Cayambe y Loja y el suelo moderno de Cayambe obtuvieron un peso seco foliar similar con 0,08 (0,21 g), 0,07 (0,19 g) y 0,08 (0,21 g), respectivamente. Por otro lado, cuando la etapa de activación se ejecutó con el tomate nativo *S. pimpinellifolium*, se observó un bloqueo de desarrollo muy fuerte de las plantas de la variedad Moneymaker en el suelo nativo de Cayambe con un peso de 0,006 (0,015 g). Sin embargo, se observó que la misma combinación en suelo nativo de

Loja demostró un efecto contrario, con un peso de 0,06 (0,16 g), incluso casi igual a los tomates variedad Moneymaker después de una etapa de activación con la misma variedad.

3.3.3. Peso seco foliar de tomates nativos *S. pimpinellifolium* en suelos nativos y modernos de Loja y Cayambe.

En la **Figura 5 (b)** se observa que los tomates nativos *S. pimpinellifolium*, previamente activados con el mismo tomate *S. pimpinellifolium* en los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja, obtuvieron un peso seco foliar de 0,06 (0,16 g) en el suelo moderno de Cayambe que fue significativamente diferente de los otros tratamientos. Por otro lado, cuando la etapa de activación se ejecutó con el tomate moderno variedad Moneymaker, se observó que el tomate nativo *S. pimpinellifolium* se desarrolló mejor en los suelos nativos de Cayambe y Loja porque se obtuvo pesos significativamente mayores con 0,07 (0,18 g) y 0,06 (0,16 g) respectivamente. Incluso mejor que los pesos secos foliares de una etapa de activación con el mismo tomate nativo *S. pimpinellifolium*.

3.4. Resultados de los análisis químico, biológico y físico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.

3.4.1. Análisis químico y biológico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.

En la **Tabla 4** se observa los resultados del análisis químico y biológico de los suelos nativos y modernos de Cayambe (Pichincha) y Zapotillo (Loja) que se utilizaron en el Experimento 3. El nitrógeno (N) en los suelos de Cayambe tanto nativo como moderno presentaron una reserva total de N y una capacidad de suministro de N a la planta superior al umbral. De esto, el suelo de Cayambe nativo presentó la mayor reserva de nitrógeno con un valor de 11740 kg N/ha y una capacidad de suministro de N igual a 210 kg N/ha. En el caso de los suelos de Loja, la reserva total de N en suelo nativo es apropiado con un valor de 3670 kg N/ha. Sin embargo, el suelo moderno está por debajo del umbral para

este elemento. Cabe mencionar, que la capacidad de suministro de N para la planta en suelos de Loja es deficiente. En el caso del fósforo (P), el suelo de Cayambe moderno se destaca porque presenta la mayor reserva de P con un valor de 885 kg P/ha y una alta cantidad de P disponible para la planta de 27,1 kg P/ha. El resto de los suelos, es decir, Cayambe nativo y Loja moderno y nativo presentan una deficiencia respecto a sus reservas de fósforo. En el caso del potasio (K), los suelos de Cayambe moderno y nativo presentan una reserva de K que sobrepasa el umbral para K con valores de 590 y 600 kg K/ha respectivamente, siendo el valor de Cayambe nativo el más alto. Además, ambos suelos modernos y nativos se caracterizan por la alta cantidad de K disponible para la planta igual a 835 y 945 kg K/ha respectivamente. Para los suelos de Loja, se evidenció una deficiencia por cumplir con el valor establecido por el umbral. Por su parte, el hierro presentó una deficiencia en todos los suelos, mientras que todo lo contrario sucedió con el magnesio, que presentó una alta disponibilidad en todos los suelos. Además, en el suelo de Cayambe moderno se registró una cantidad de 805 kg Mg/ha, en Cayambe nativo 1250 kg Mg/ha, en Loja moderno 910 kg Mg/ha y en Loja nativo 1140 kg Mg/ha. Finalmente, de acuerdo con el análisis biológico de los suelos de Cayambe y Loja, tanto modernos como nativos superaron el umbral para la cantidad de biomasa microbiana presente en cada suelo. Es interesante mencionar, que los suelos nativos de Cayambe y Loja presentaron una mayor cantidad de biomasa microbiana con valores de 2310 y 1459 mg C/kg respectivamente, en comparación con los suelos modernos de los mismos sitios.

3.4.2. Análisis físico de suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja.

En la **Tabla 5** se muestra un resumen de los resultados de los análisis físicos de los suelos nativos y modernos de Cayambe (Pichincha) y Zapotillo (Loja) que se utilizaron en el Experimento 3. Se observó que el suelo moderno de Loja presenta un pH neutro (7,1). En contraste, el resto de los suelos presentaron mediciones de pH en rango de acidez

acorde con el umbral establecido. Por otro lado, el porcentaje de materia orgánica de 5,3 en el suelo moderno de Cayambe y de 5,4 en el suelo nativo de Loja es adecuado puesto que indica que el suministro total requerido de materia orgánica es efectivo. Cabe mencionar que para el suelo nativo de Cayambe se evidencia la presencia de abundante materia orgánica con porcentaje de 9.7 superior al resto. En cuanto a la textura de los suelos, todos presentan un buen porcentaje de arena, mientras que el porcentaje de arcilla y limo están por debajo del estándar en los suelos.

3.5.Posibles resultados de la secuenciación de los microbiomas de las rizosferas de tomates modernos y nativos en suelos modernos y nativos de Cayambe y Loja

Al final del Experimento 3, se tomaron muestras de la rizosfera y *bulk soil* de los tomates nativos y modernos de los tratamientos en los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja. Después de la extracción del ADN total, 80 muestras fueron enviadas a la empresa BaseClear donde se encuentran en proceso de secuenciación. Debido a la situación actual con el COVID-19, esta sección se basará en los posibles resultados de esta investigación, si se hubiera contado con las secuencias del microbioma al momento de la entrega de este reporte. Entonces, para construir una visión de los posibles resultados moleculares, se consideró un estudio del microbioma rizosférico de tomate moderno en suelo agrícola del valle de Guasave, México, donde se usó los genes 16S para procariotas y 18S para eucariotas. En la **Figura 6 (a)** de ese estudio, mostró que el filo Firmicutes fue el más abundante de las procariotas con un 45%. A continuación, el filo Proteobacteria con un 15% y el filo Gemmatimonadetes con un 13%. Por otro lado, **Figura 6 (b)** el filo más abundante de los eucariotas fue Ascomycota con un 59% (Cordero et al, 2012). En otro estudio de referencia, se evidenció una alta abundancia del filo Firmicutes en los suelos nativos y agrícolas en el tratamiento *bulk soil* de suelos de la provincia de Loja, en el sur de Ecuador (Obando, 2020).

4. DISCUSIÓN

Este estudio es uno de los primeros en utilizar un enfoque multidisciplinario para explorar el microbioma de la rizosfera asociado al tomate nativo *Solanum pimpinellifolium* en suelo nativo (hábitat natural del tomate) y en suelo moderno (agrícola) de la zona de Zapotillo, Loja. Además, en este estudio se incluyen tomates modernos y un tomate criollo para evaluar su desempeño en suelos nativos y modernos (agrícolas) de Cayambe y Calacalí, Pichincha.

En el **Experimento 1** que se dirigió a la evaluación de la respuesta fenotípica de tomates modernos *Solanum lycopersicum* cv. Cherry y cv. Pomodoro que se desarrollaron en suelos nativos autoclavados y no tratados de Calacalí y Cayambe, se obtuvo un resultado común de las dos variables estudiadas “altura” y “peso seco foliar”. Ambos tomates modernos, de la variedad Cherry y de la variedad Pomodoro registraron las mayores alturas y el mejor rendimiento de peso seco foliar en los suelos nativos de Cayambe no tratados, es decir, que no pasaron por un proceso de esterilización (**Figuras 2 (a) y 2 (a)**). En este resultado puede estar implicado el componente microbiano del suelo nativo de Cayambe. Según los resultados del análisis, específicamente este suelo nativo de Cayambe contiene la más alta cantidad de biomasa microbiana de todos los suelos analizados (2310 mg C/kg). De manera que, los microorganismos presentes en el suelo ayudaron a las plantas a desarrollarse mejor (Pérez-Jaramillo et al, 2019). Lo que confirma este patrón, es el resultado de las plantas que crecieron en el suelo nativo de Cayambe donde el componente microbiano fue eliminado con el proceso de esterilización por autoclave. Además, este suelo fue interesante porque cuenta con una alta cantidad de nitrógeno (11 740 kg N/ha). Estudios indican que una alta cantidad de este elemento es un indicativo de la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Puesto que las plantas no lo pueden absorber directamente y estas bacterias que viven en simbiosis con las

plantas se encargan de tomar el nitrógeno del aire para hacer más fácil su incorporación en el suelo y en la planta (Calvo, 2011). Cabe mencionar, que este suelo nativo se colectó en las cercanías del volcán Cayambe, de manera que la presencia de tierra volcánica pudo haber influenciado en la composición especial de este suelo. Por otro lado, a pesar de que fue mayor la altura y peso seco foliar de los tomates modernos de las variedades Cherry y Pomodoro en el suelo nativo de Cayambe no esterilizado, se observó que las plantas también crecieron en el suelo esterilizado, pero con un desempeño menor. Esto puede estar influenciado por el componente nutricional del suelo que presenta una alta cantidad de nitrógeno y potasio (600 kg K/ha) que son los dos macronutrientes más importantes para un buen desempeño del tomate en su etapa de crecimiento (Sainju et al, 2003).

En el **Experimento 2** de la evaluación de la respuesta fenotípica de tomates modernos, tomate criollo *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme y tomate nativo *S. pimpinellifolium* que se incluyeron por primera vez y que se desarrollaron en suelos nativos de Calacalí y Cayambe se obtuvo un resultado similar de las dos variables estudiadas “altura” y “peso seco foliar”. Todos los tipos de tomates obtuvieron una mayor altura y mejor rendimiento del peso seco foliar en el suelo nativo de Cayambe, en contraste con el suelo nativo de Calacalí (**Figura 3 (a) y 3(b)**). Esto se puede justificar de la misma manera, como se concluyó en la discusión del Experimento 1, por el hecho de que el suelo nativo de Cayambe presenta un buen componente nutricional tanto en nitrógeno como en potasio. Estudios mencionan que el tomate requiere de nitrógeno en gran cantidad para un buen desarrollo, debido a que este es un elemento de proteínas y aminoácidos que son vitales para el crecimiento y reproducción de las plantas de tomate (Sainju et al, 2003), y su deficiencia genera el envejecimiento prematuro de las hojas y desacelera el desarrollo del tomate (Pereira et al, 2011). Por otro lado, el potasio es el nutriente más absorbido por el tomate ya que este proporciona robustez a la zona foliar

(Sainju et al, 2003), y su deficiencia reduce el rendimiento de la planta (Pereira et al, 2011). En el caso del suelo de Calacalí no se realizaron análisis físico, químicos o biológicos pero la bibliográfica reporta que es un suelo que se caracteriza por ser rocoso, no apto para desarrollo económico y agrícola (Secretaria Técnica Planifica Ecuador, 2019). Como se mencionó todos los tomates se desarrollaron mejor en el suelo nativo de Cayambe, sin embargo, solo dos tipos de tomate destacaron por presentar los mejores rendimientos en altura y peso seco foliar (**Figura 3 (a) y 3(b)**). Estos fueron el tomate moderno variedad Floradade y el tomate nativo *S. pimpinellifolium*. Una observación que es importante mencionar es que, aunque *S. pimpinellifolium* presentó las plántulas más altas de todos los tipos de tomate, se observó que la altura no se correlacionó con el peso seco foliar de estos tomates. Es decir, altas plántulas resultaron con pesos bajos, mientras que las tendencias de altura en los otros tres tipos de tomates fueron las mismas tendencias en las mediciones de su biomasa seca. No se encontró publicaciones previas que mencionaran este fenómeno específicamente para *S. pimpinellifolium*, pero respecto al desempeño del tomate, se debe colocar mayor énfasis en el peso seco, ya que es el parámetro más preciso. Sin embargo, en base a los pesos secos foliares, los dos tomates moderno y nativo presentaron los pesos más altos en los suelos de Cayambe en contraste con los suelos de Calacalí.

Literatura previa indica que el componente microbiano benéfico asociado a las raíces de los tomates es muy importante para diversos procesos fisiológicos que incluyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cordovez et al, 2019). Debido a que las raíces de las plantas tienen la capacidad de reclutar microorganismos benéficos del suelo como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) que incluye una gran variedad de géneros como *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillus*, etc. Sus funciones incluyen la regulación del

desarrollo de las plantas, la solubilización de fosforo, biofertilizantes, promoción de resistencia a estrés biótico y abiótico, entre otras (De la Peña, 2014). Por otro lado, es difícil directamente correlacionar los resultados obtenidos en el Experimento 2 con el microbioma que brinda cada tipo de suelo, pero, si estos suelos hubieran sido suelos nativos donde naturalmente crecen tomates nativos, es probable que el efecto del componente microbiano sea mucho más fuerte en el tomate nativo *S. pimpinellifolium* debido a que es una especie silvestre que no ha atravesado un proceso de domesticación como las múltiples variedades del tomate moderno *S. lycopersicum* cv. Floradade, por ende, puede presentar microorganismos más especializados y menos agotados que contribuyen a su desarrollo (Pérez-Jaramillo et al., 2019). Por el hecho de que ambos suelos no forman parte del hábitat natural de tomates nativos, independientemente de los resultados que, si indicaron que estos suelos de Cayambe proporcionan un mejor crecimiento de los tomates, el papel del microbioma nativo fue difuso probablemente porque la comunidad microbioma no fue la óptima para que los tomates adquirieran un efecto máximo en su fisiología.

En el **Experimento 3** se direccionó a la evaluación fenotípica del tomate nativo *S. pimpinellifolium* y el tomate moderno *S. lycopersicum* cv. Moneymaker como una de las variedades más exitosas y por ende más sembrada en el mundo (Chang, 2016). En diferencia a los últimos dos experimentos, por primera vez se incluyeron suelos nativos provenientes de Zapotillo, Loja, donde naturalmente crecen tomates nativos *S. pimpinellifolium* (Zuriaga et al, 2009). También se seleccionó a Cayambe, como suelo nativo porque presentó los mejores resultados en los experimentos anteriores. En ambos sitios, se colectaron suelos modernos (agrícolas). Por el parámetro de altura de la planta, hay evidencia que la combinación entre el tipo de tomate y el tipo de suelo influyó en el desarrollo de las plantas de tomate (**Figura 4**). Los resultados de los tratamientos sin

intercambio, es decir, donde se aplicó una etapa de activación del suelo con el mismo tipo de tomate moderno *S. lycopersicum* cv. Moneymaker o nativo *S. pimpinellifolium* en la segunda etapa del experimento, indican que el peso seco foliar de la variedad Moneymaker fue mayor a *S. pimpinellifolium*. Esta observación está confirmada por otras publicaciones que mencionan que el tomate moderno variedad Moneymaker bajo condiciones favorables, puede fijar mayor biomasa (Caguana, 2003). En el presente estudio también se evidenció que en el tratamiento con *S. pimpinellifolium* después de una etapa de activación por parte del mismo tipo de tomate *S. pimpinellifolium*, las plantas pudieron igualar el peso seco de Moneymaker en el suelo moderno (agrícola) de Cayambe y el suelo nativo de Loja. Cuando los tratamientos de intercambio se realizaron con una etapa previa de activación del suelo por el otro tipo de tomate, los resultados de este experimento demostraron que las variaciones más grandes en el experimento fueron encontradas en los suelos nativos después de una fase de activación del suelo con el tomate nativo *S. pimpinellifolium*. El efecto fue aún más fuerte en el suelo nativo de Cayambe, donde las plántulas de Moneymaker sí pudieron germinar, pero su crecimiento fue completamente bloqueado después de la germinación cuando la etapa previa de activación fue hecha por tomate nativo *S. pimpinellifolium*. Una manera de explicar estos resultados se basa en el estado nutricional de los suelos en combinación con la resistencia innata a deficiencias por el estado nutricional, brindado por la genética del tipo de tomate (Sánchez, 2017). Aunque el suelo nativo de Cayambe en general contiene más nutrientes en comparación con el suelo nativo de Loja (**Tabla 4**), ambos suelos nativos tienen graves deficiencias en fósforo con 80 kg P/ha y 135 kg P/ha, respectivamente, lo que posiblemente fue la causa de los problemas en desarrollo en las plantas. Debido a que la deficiencia del fósforo causa el retraso del desarrollo de la raíz y por ende el pronto establecimiento de la planta (Sainju et al., 2003). Sin embargo, se puede hipotetizar que

S. pimpinellifolium, por ser una especie silvestre, demuestra un mejor desempeño en suelos nativos que pertenecen a su hábitat natural, donde evolucionó y sobrevivió bajo condiciones adversas, es decir, en constante desafío con las deficiencias nutricionales observadas, y probablemente los desafíos con la presencia de agua, por ser ecosistemas semidesérticos (Zuriaga et al, 2009). Por otro lado, se puede observar que tanto el tomate moderno como el nativo crecieron bien en los suelos nativos de Loja. Esto lleva a considerar el microbioma benéfico como previamente se discutió en el Experimento 2. En base a la literatura, se planteó la hipótesis de que el suelo nativo de Loja, que forma parte del hábitat natural del tomate nativo *S. pimpinellifolium* contiene los microorganismos dentro del microbioma del suelo con los cuales coevolucionó. Estos le ayudaron a crecer en condiciones adversas como la deficiencia nutricional. Además, la “comunicación” del microbioma nativo con su planta nativa *S. pimpinellifolium* ayudó a establecer asociaciones benéficas que le proporcionan un mejor desempeño (Pascale et al, 2019). Al contrario, el suelo nativo de Cayambe no es caracterizado como hábitat de tomates nativos y por esta razón no evolucionó en combinación con tomates nativos. Por lo cual, al llegar a este punto, no es extraño que el resultado más grande del experimento se dio en el tomate moderno variedad Moneymaker cultivado en suelo nativo de Cayambe, después de una ronda previa de activación con tomate nativo. Esto podría apoyarse en el hecho de que el crecimiento de la variedad Moneymaker se estableció en un suelo deficiente de fósforo, gracias a una conexión que hubo con el microbioma nativo de tomate *S. pimpinellifolium* con el que fue activado previamente este suelo (Pérez-Jaramillo et al, 2019). Finalmente, el suelo donde no se observó diferencias entre los tratamientos fue el suelo moderno (agrícola) de Loja. Debido a que presentó una deficiencia de fósforo y además pertenece a un sistema agrícola que usa una gran cantidad de pesticidas para la protección del cultivo. Entonces el desbalance nutricional y la

alteración negativa del microbioma por parte de los agentes químicos pudo haber limitado a este suelo para el cultivo exitoso de tomates (Hartman et al, 2019).

Como se explicó en la última sección de los resultados, las 80 muestras de la rizosfera y de *bulk soil* de los tomates nativos y modernos se encuentran en proceso de secuenciación y que no se ha concluido al momento de la entrega de este trabajo. Sin embargo, con la llegada de los resultados de la secuenciación se espera encontrar una comunidad microbiana benéfica asociada los tomates nativos y modernos. Por lo pronto, en la investigación del microbioma rizosférico en tomates modernos en suelos agrícolas de Guasave, México, el filo Firmicutes fue el más abundante de los procariontes y que es de importancia por su capacidad de biocontrol en hábitats que han atravesado cambios, como con los suelos agrícolas. Además, este filo incluye a la especie bacteriana *Bacillus subtilis* que es una antagonista de fitopatógenos del tomate. El segundo filo más abundante fue Proteobacteria, que de acuerdo con estudios se encuentra en suelos supresivos de *Rhizoctonia solani* un patógeno que causa marchitez. (Cordero et al, 2012). Estos resultados fueron confirmados en otro estudio de microbioma rizosférico de tomates nativos en los suelos nativos y agrícolas de Loja, donde también se evidenció una alta abundancia del filo Firmicutes en los suelos modernos (agrícolas) en comparación con una dominancia del filo Proteobacteria en las rizosferas de plantas de tomate nativo *S. pimpinellifolium* (Obando, 2020). Por último, no se encontraron publicaciones científicas que proporcionen una idea sobre el microbioma nativo de suelos de Cayambe. Pero por el hecho de que los diferentes tipos de tomates demostraron un buen desempeño en estos suelos, es probable que las comunidades de microorganismos benéficas de los suelos de Cayambe puedan ser naturalmente supresivas de enfermedades.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, los suelos nativos de Loja y Cayambe influyen en un buen desempeño de altura y peso seco foliar de los tomates modernos y nativos. En este contexto, el tomate nativo *Solanum pimpinellifolium* registró un mejor desempeño en el suelo nativo de Loja. Esto corresponde al hecho de que el suelo de Loja es el hábitat natural del tomate nativo *Solanum pimpinellifolium* y esto hace posible que contenga microorganismos benéficos dentro del microbioma del suelo con los que coevolucionó el tomate nativo y donde existe una estrecha comunicación entre el microbioma nativo del suelo con su tomate nativo. De tal forma, que esto estimula el desarrollo del tomate nativo en condiciones adversas como es la deficiencia nutricional que existe en el suelo nativo de Loja.

Por otro lado, el suelo nativo de Cayambe mostró un mejor desempeño con tomates modernos que con los tomates nativos. Esto se asocia a que el suelo nativo de Cayambe no es caracterizado como hábitat de tomate nativo y por esta razón no evolucionó en combinación con dicho tomate. Por esto, se esperó evidenciar el mejor resultado en suelo nativo de Cayambe con el tomate moderno Moneymaker. En donde está implicado el componente nutricional de este suelo, influenciado por contar con tierra volcánica. Sin embargo, es importante mencionar que en este resultado también influyó la fase previa de activación del suelo con tomate nativo *Solanum pimpinellifolium*.

Finalmente, con la llegada de los resultados de la secuenciación de las 80 muestras del microbioma rizosférico y *bulk soil* se espera encontrar una comunidad microbiana benéfica asociada a los tomates nativos y modernos.

6. Referencias Bibliográficas

- Burton, M., Ibarra-Juárez, L., Ibarra-Lacletter, E. & Lamelas, A. (s.f.). El potencial del microbioma en la biotecnología. *INECOL*. Recuperado el 12 de abril de 2020 de <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-1/quienes-somos>
- Caguana, M. (2003). El cultivo de tomate riñón en invernadero (*Lycopersicon esculentum*). *Asociación de Agrónomo Indígenas de Cañar*. Recuperado el 20 de abril de 2020 de https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com/&httpsredir=1&article=1366&context=abya_yala
- Callahan B., McMurdie P., Rosen M., Han A., Johnson A. & Holmes S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 13, 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Calvo, S. (2013). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Dialnet plus*. 3, 173 – 186. Recuperado el 20 de abril de 2020 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3761553>
- Chang, J. (2016). Caracterización de seis poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* de las regiones Piura y Lima respecto de su resistencia a *Phytophthora infestans*. *Universidad Peruana Cayetano Heredia*. Recuperado el 14 de abril de 2020 de <http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/327/Caracterizaci%C3%B3n%20de%20seis%20poblaciones%20de%20Solanum%20pimpinellifolium%20de%20las%20regiones%20Piura%20y%20Lima%20respecto%20de%20su%20resistencia%20a%20Phytophthora%20infestans.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

- Cordero, J., Rivera, R., Calderón, C., Figueroa, A., Martínez, J., Levya, K., Cervantes, R. & Maldonado, I. (2012). Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle Guasave, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83(3). <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.17897>
- Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V. & Raaijmakers, J. (2019). Ecology and Evolution of Microbiomes. *Annual Review of Microbiology*. 73 (3), 3.1-3.20 <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062524>
- Cortés, N., Montor, J., Olvera, C., Peña, J. & del Moral, S. (2014). Metagenómica: una ventana de oportunidad nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. Recuperado el 12 de abril de 2020 de <http://www.reibci.org/publicados/2014/diciembre/0700103.pdf>
- De la Peña, C. & Loyola, V. (2014). Biotic Interactions in the Rhizosphere: A Diverse Cooperative Enterprise for Plant Productivity. *Plant Physiology*. 166, 701-719. <https://doi.org/10.1104/pp.114.241810>
- FAO. (2001). Sección3 Evaluación y medición del cultivo. *FAO*. Recuperado el 28 de marzo de 2020 <http://www.fao.org/3/x8234s/x8234s06.htm>
- FAO. (2017). The future of food and agriculture - Trends and challenges. *FAO*. Recuperado el 10 de marzo de 2020 de <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- FAOSTAT. (2018). Cultivos. *FAO*. Recuperado el 10 de marzo de 2020 de <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC>
- FAOSTAT. (2018). Países por producto. *FAO*. Recuperado el 10 de marzo de 2020 de http://www.fao.org/faostat/es/?#rankings/countries_by_commodity

- Ghosh, A., Mehta, A. & Khan, A. (2019). Metagenomic Analysis and its Applications. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 3, 184-193.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7>
- Hartman, K. & Tringe, S. (2019). Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress. *Biochemical Journal*. 476(19), 2705-2724
<https://doi.org/10.1042/BCJ20180615>
- López, L. (2016). Manual técnico del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. Programa Regional de Investigación e Innovación por Cadenas de Valor Agrícola (UE/IICA). Recuperado el 17 de marzo de 2020 de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Merriam Webster. (s.f.). Microbiome. En el diccionario Merriam-Webster.com. Recuperado el 12 de abril de 2020 <https://www.merriam-webster.com/dictionary/microbiome>
- Morales, M., Espinosa, G., Morales, A., Sánchez, B., Jiménez, A. & Milián, Y. (2014). Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 16(1), 62-73.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.38259>
- Obando, E. (2020). *Exploration of beneficial microorganisms associated with seeds and roots of tomatoes in native soils of Ecuador*. Trabajo de fin de carrera. Mayo 2020. Universidad San Francisco de Quito.
- Orcutt, M. (2016). El microbioma vegetal podría aumentar un 10% la producción de los cultivos. *MIT Technology Review*. Recuperado el 7 de septiembre de 2018 de

<https://www.technologyreview.es/s/5592/el-microbioma-vegetal-podria-aumentar-un-10-la-produccion-de-los-cultivos>

Pascale, A., Proietti, S., Pantelides, I. & Stringlis, I. (2019). Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01741>

Pereira, C., Maycotte, C., Restrepo, B., Mauro, F., Calle, A., Velarde, M., Marín, G., Álvarez, M. & Portela, H. (2011). Sistema de producción vegetal II. Proyecto *Universidad en el Campo*. Recuperado el 20 de abril de 2020 de https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/4781/sistemas_de_produccion_vegetal_2.pdf

Pérez, Jaramillo, J., de Hollander, M., Ramírez, C., Mendes, R., Raaijmakers, J. & Carrión, V. (2019). Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (*Phaseolus vulgaris*) in native and agricultural soils from Colombia. *Microbiome*. 7 (1), 2-16. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0727-1>

Pérez-Jaramillo, J., Carrión, V., de Hollander, M. & Raaijmakers, J. (2018). The wild side of planta microbiomes. *Microbiome*. 6 (143). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>

Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A., Nieuwdorp, M. & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE*. 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>

Sainju, U., Dris, R. & Singh, B. (2003). Mineral nutrition of tomato. *Fort Valley State University*. Recuperado el 20 de abril de 2020 de https://www.researchgate.net/publication/228960277_Mineral_nutrition_of_tom

ato?fbclid=IwAR1KPIiJpX6IGY_uAYPzqiT2C0BrbpLeJyLQde7YNcdW6V1H
nJsFDszlWYk

Sánchez, J. (2017). Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal. *Universidad Politécnica de Valencia*. Recuperado el 14 de abril de 2020 de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/78617/S%C3%81NCHEZ%20-%20Generaci%C3%B3n%20de%20l%C3%ADneas%20T-DNA%20de%20tomate%20%28Solanum%20lycopersicum%29%20para%20la%20identificaci%C3%B3n%20de%20m....pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Secretaría Técnica Planifica Ecuador. (2019). PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PARROQUIA CALACALÍ. *Sistema Nacional de Información*. http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/1768117730001_DIAGNOSTICO%20PDOT%20CALACALI%202015-2019_30-10-2015_23-39-24.pdf

Suárez, A. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*. 30(5), 305-311. Recuperado el 12 de abril de 2020 <https://seq.es/wp-content/uploads/2017/09/suarez17jul2017.pdf>

Turner, T., James, E. & Poole, P. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14(6), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>

Valarezo, O., Cañarte, E., Navarrete, B. & Arias, M. (2003) *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) principal plaga del tomate en Ecuador. *INIAP*. Recuperado el 22

de abril de 2020 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=EC2005000003>

Vázquez, A. (2016). Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano. *Universidad Complutense*. Recuperado el 12 de abril de 2020

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA%20VAZQUEZ%20ESCRIBANO.pdf>

Zuriaga, E., Blanca, J., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W., Morales, R. & Nuez, F. (2009). Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genet Resour Crop Evol.* 56 (39). <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9340-z>

7. ANEXO A: TABLAS

Tabla 1. Áreas de colecta de suelos nativos y modernos

Zona	Tipo de suelo	Coordenadas	
		Sur	Este
Cayambe, Pichincha	Nativo	0.011316	-78.054611
	Moderno	0.013022	-78.079577
Zapotillo, Loja	Nativo	-4.262351	-80.189306
	Moderno	-4.275202	-80.198269
Calacalí, Pichincha	Nativo	0.012901	-78.543277

Tabla 2. Tipo de tomate moderno, nativo y criollo

Tipo de genotipos de tomate	Especie o Variedad	Distribuidor/Proveedor
Tomate moderno	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker	Distribuidor comercial
	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Cherry	Distribuidor comercial
	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Pomodoro	Distribuidor comercial
	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Floradade	Distribuidor comercial
Tomate nativo	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Banco de Germoplasma de Loja, Universidad Nacional de Loja
Tomate criollo	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Cerasiforme	de Loja, Universidad Nacional de Loja

Tabla 3. Diseño experimental del experimento 3

Sitio	Tipo de suelo	Genotipos de tomate	
		Fase de activación	Fase de intercambio
Cayambe, Pichincha	Moderno	Moneymaker	Moneymaker
			<i>S. pimpinellifolium</i>
		<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>
			Moneymaker
	Nativo	Moneymaker	Moneymaker
			<i>S. pimpinellifolium</i>
		<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>
			Moneymaker

Zapotillo, Loja	Moderno	Moneymaker	Moneymaker
			<i>S. pimpinellifolium</i>
		<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>
			Moneymaker
	Nativo	Moneymaker	Moneymaker
			<i>S. pimpinellifolium</i>
		<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>
			Moneymaker

Tabla 4. Análisis químico y biológico de los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja

Parámetros	Unidad	Target value	Cayambe moderno	Target value	Cayambe nativo	Target value	Loja moderno	Target value	Loja nativo
Stock total de N	kg N/ha	2850-4000	6510	2560 – 3590	11740	3010 – 4210	2410	2850 – 3980	3670
N-capacidad de suministro	kg N/ha	95-145	110	95-145	210	95 – 145	35	95 – 145	50
P-stock en suelo	kg P/ha	385 – 535	885	345 – 480	80	405 – 565	330	385 – 535	135
P- disponible planta	kg P/ha	3,7 – 6,6	27,1	3,3 – 5,9	1,3	3,9 – 6,9	2,1	3,7 – 6,5	2
K- stock en suelo	kg K/ha	335 – 470	590	430 – 570	600	390 – 535	225	350 – 490	245
K- disponible planta	kg K/ha	200 – 315	835	180 – 280	945	210 – 330	130	200 – 315	240
Fe- disponible planta	g Fe/ha	7140 – 12840	<5820	6410 – 11540	<5280	7530 – 13550	<6140	7120 – 12810	<5810
Mg- disponible planta	kg Mg/ha	375 - 470	805	335-420	1250	395 - 495	910	375 - 465	1140
Biomasa microbiana	mg C/kg	265 - 795	1820	485 - 1455	2310	170 - 510	1197	270 - 810	1459

Tabla 5. Análisis físico de los suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja

Parámetros	Unidad	Target value	Cayambe moderno	Cayambe nativo	Loja moderno	Loja nativo
Acidez (pH)	NA	5,5 - 6,1	5,6	5,5	7,1	6,3
C-orgánico	%	NA	2,5	5,2	1,1	2
Materia orgánica	%	NA	5,3	9,7	3,4	5,4
Arcilla	%	NA	10	15	11	13
Limo	%	NA	30	38	26	30
Arena	%	NA	55	37	60	51

8. ANEXO B: FIGURAS

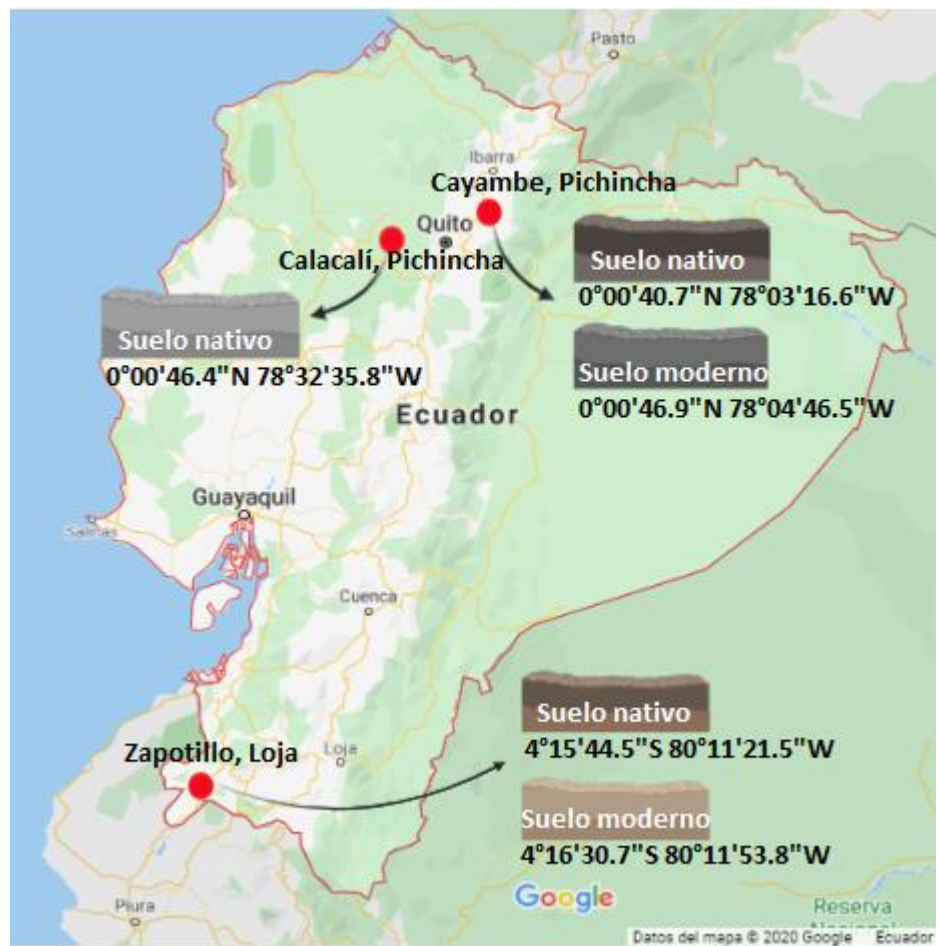


Figura 1. Mapa de Ecuador de las áreas de colecta de suelos nativos y modernos

Fuente: Google Maps, 2020

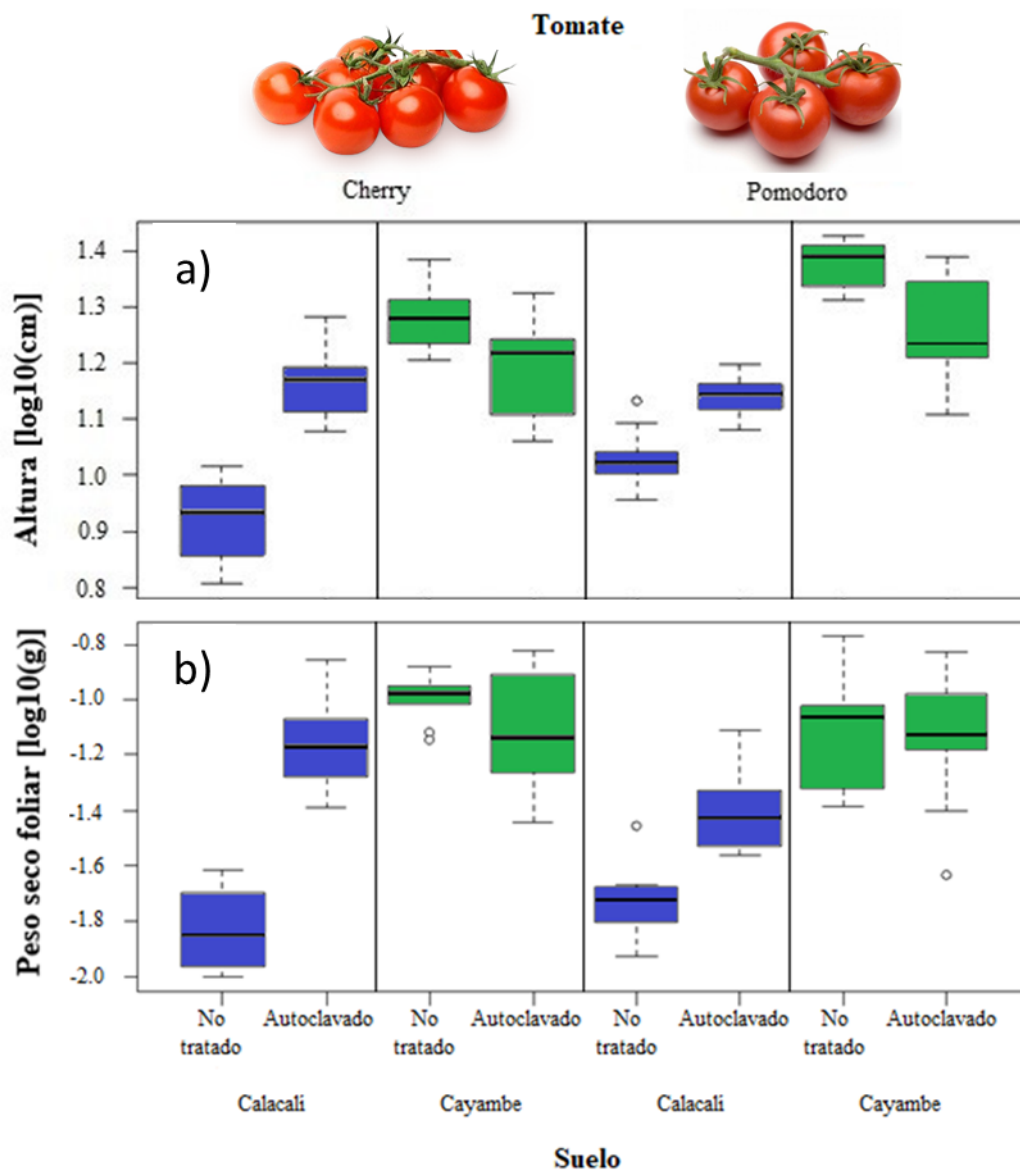


Figura 2. Altura (a) y peso seco foliar (b) de tomates modernos *S. lycopersicum* cv. Cherry (izquierda) y cv. Pomodoro (derecho) en suelos nativos de Calacalí y Cayambe no tratados y autoclavados.

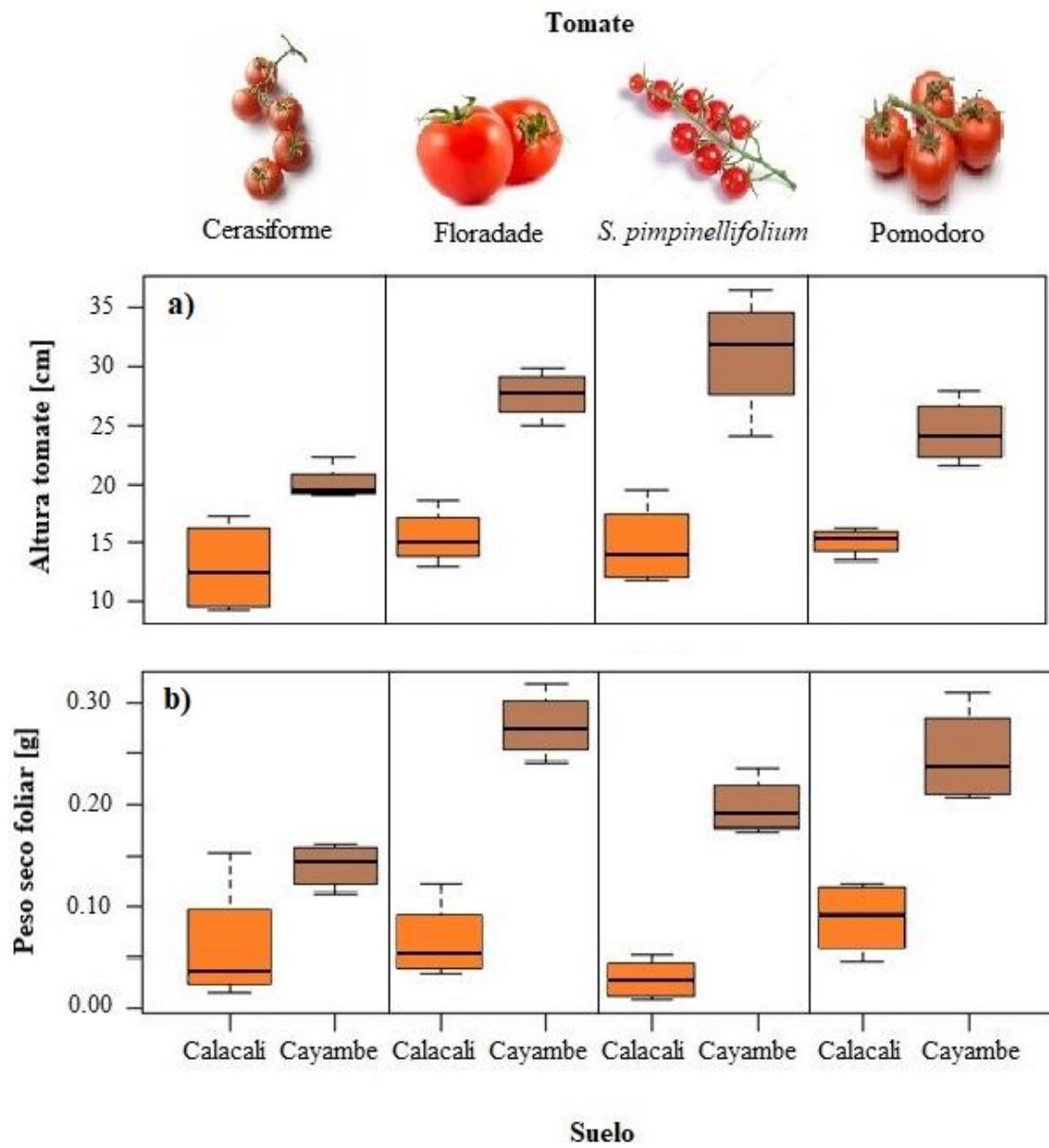


Figura 3. Altura (a) y peso seco foliar (b) de tomates modernos *S. lycopersicum* cv. Floradade y cv. Pomodoro, tomate criollo *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme y tomate nativo *S. pimpinellifolium* en suelos nativos de Calacalí y Cayambe

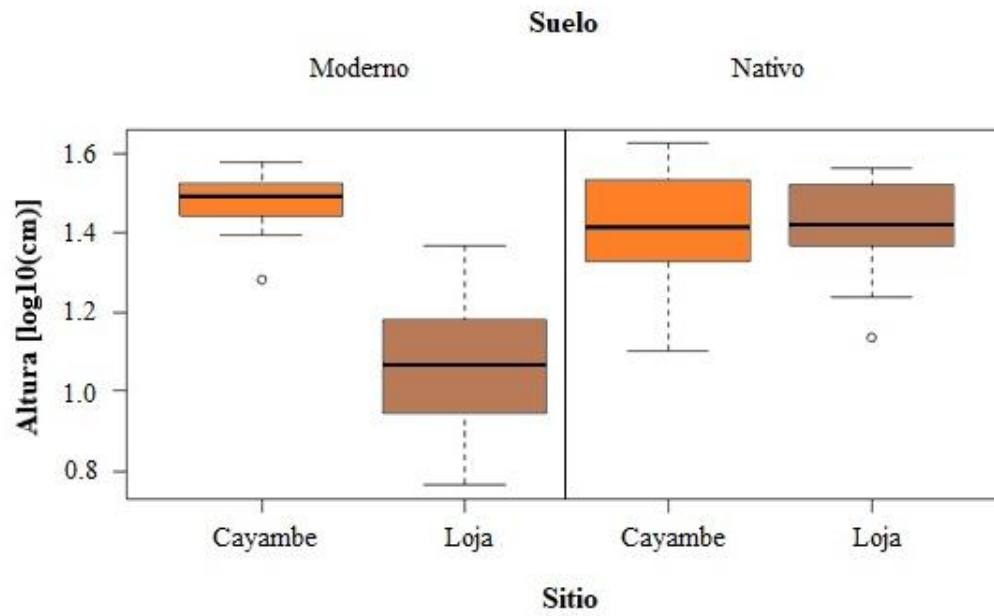


Figura 4. Altura de tomates de acuerdo con el sitio Cayambe y Loja y tipo de suelo moderno y nativo

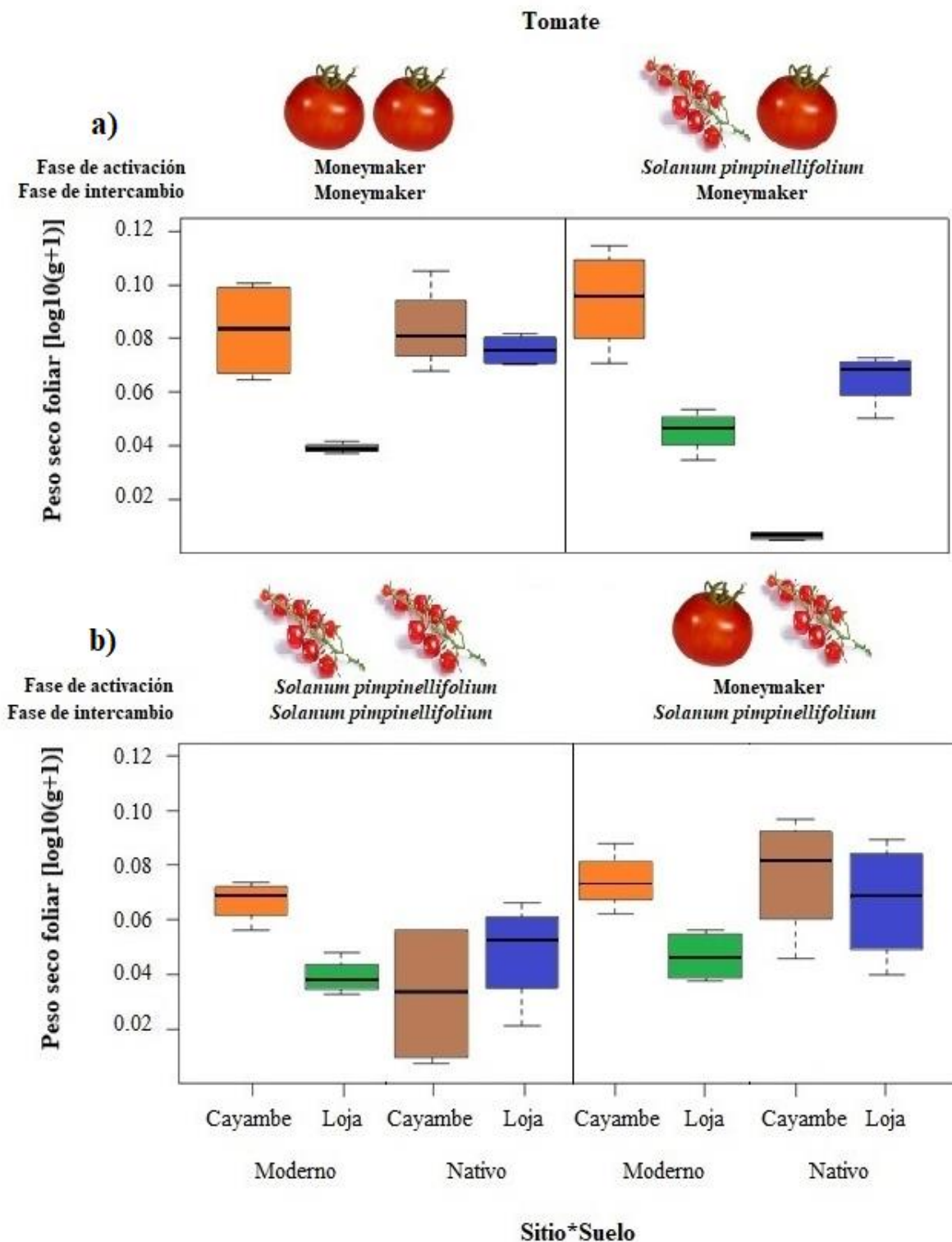
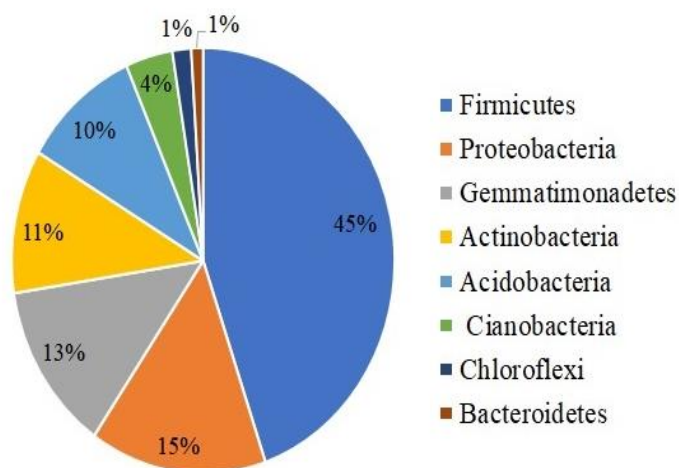


Figura 5. Peso seco foliar de tomates modernos *S. lycopersicum* cv. Moneymaker de la fase de intercambio con previa fase de activación con *S. lycopersicum* cv. Moneymaker y *S. pimpinellifolium* en suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja (a). Peso seco foliar de tomates nativos *S. pimpinellifolium* de la fase de intercambio con previa fase de activación con *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* cv. Moneymaker en suelos nativos y modernos de Cayambe y Loja (b).

a) Análisis 16S: Filo de procariotas



b) Análisis 18S: Filo de eucariotas

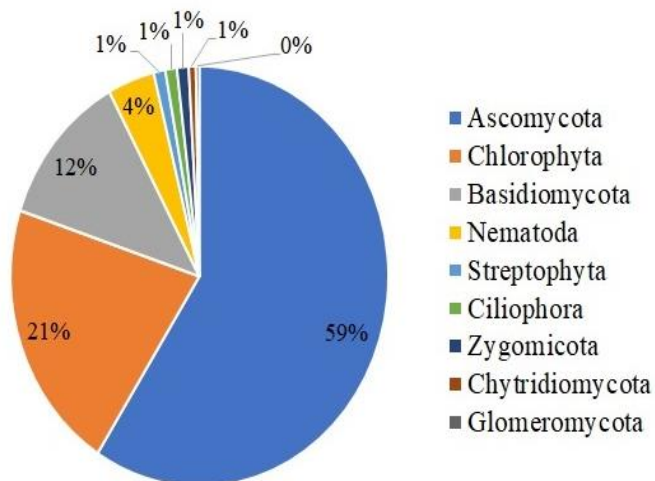


Figura 6. Filos de procariotas del análisis con el gen 16S (a) y filos de eucariotas del análisis con el gen 18S (b) del microbioma de la rizosfera de tomate moderno de un estudio hecho en la región de Guasave, México (Cordero et al., 2012)