

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Explorando un increíble mundo filamentoso: Estudio comparativo del microbioma
asociado con las raíces de tomate nativo y moderno de la Sierra ecuatoriana**

Andrea Cristina Molina Almeida

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito

para la obtención del título de

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 14 de mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

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

**Explorando un increíble mundo filamentoso: Estudio comparativo del microbioma
asociado con las raíces de tomate nativo y moderno de la Sierra ecuatoriana**

Andrea Cristina Molina Almeida

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van 't Hof, Ph.D

Quito, 14 de mayo de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Andrea Cristina Molina Almeida

Código: 00136284

Cédula de identidad: 1717765299

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

El tomate es una planta de gran importancia comercial, la cual tiene una gran cantidad de relaciones con los microorganismos de la rizosfera. Sin embargo, poco se conoce acerca de estas relaciones, aún más cuando son parte del Reino Fungi o de los tipos de cambios que se han producidos con respecto de estas comunidades durante el proceso de domesticación, que eventualmente provocó que las plantas silvestres ancestrales con gran diversidad microbiana en la raíz y con alta resistencia al estrés biótico y abiótico, se volvieran cada vez menos resistentes en los cultivos modernos.

La hipótesis es que los cultivos modernos probablemente cambiaron la composición de su microbiota benéfica de la rizosfera. El presente estudio tiene como objetivo investigar a nivel molecular la diversidad taxonómica y funcional del microbioma de la raíz, el cual consiste en las comunidades de hongos que establecen asociaciones con el tomate nativo *Solanum pimpinellifolium* y con el tomate domesticado *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Técnicas moleculares fueron utilizadas para la secuenciación del gen ITS en muestras de la rizosfera de ambos tomates; para subsecuentemente, analizar el microbioma de los tomates que crecieron en suelo natural y agrícola en las localidades de Cayambe y Loja, usando una serie de herramientas bioinformáticas. Contrario a lo planteado en la hipótesis, la diferencia de composición de hongos en los suelos no fue influenciada por el tipo de tomate, pero si por su composición microbial inicial. Las diferencias fueron explicadas por las familias *Chaetomiaceae*, *Stachybotryaceae*, *Ascobolaceae*, *Nectriaceae*, *Aspergillaceae*, *Pleosporaceae* y grupos no identificados. Sin embargo, fue un desafío determinar la identidad exacta de los ASVs, dado que en la actualidad existen pocos estudios sobre la microbiota de la rizosfera de suelos de Ecuador; y mucho menos, sobre la comunidad fúngica de esta región.

Palabras clave: Rizosfera, tomate, ITS, microbioma, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*, Andes ecuatorianos

ABSTRACT

The tomato is a plant of great commercial importance, which has many important relationships with the microorganisms of the rhizosphere. However, little is known about the organisms that establish these relationships, even more when they are part of the Fungi kingdom or the kind of changes which may have occurred with respect to these communities during the domestication process. This process eventually resulted in the change of wild ancestral plants with great microbial root diversity and a high resistance to biotic and abiotic stress, towards modern cultivars which are less resistant compared to their wild relatives, and it is hypothesized that the composition of their beneficial rhizosphere microbiota has been changed for modern tomato cultivars. The present study aims to investigate at the molecular level the taxonomic and functional diversity of the root mycobiome, which consists of the fungal communities that establish associations with the native tomato *Solanum pimpinellifolium* and the domesticated, modern tomato variety *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Molecular techniques were used to sequence the ITS amplicon in rhizosphere samples of both tomatoes, to subsequently analyze the mycobiome of tomatoes grown in natural and agricultural soils from Cayambe and Loja, using a series of bioinformatic tools.

Contrary to our hypothesis, differences in the fungal composition of the soils was not influenced by the type of tomato, but by the initial microbial composition of the soils. The differences were explained by fungal families *Chaetomiaceae*, *Stachybotryaceae*, *Ascobolaceae*, *Nectriaceae*, *Aspergillaceae*, *Pleosporaceae*, and unidentified groups. However, it has proven a challenge to determine all identified ASVs, as public molecular databases contain little information regarding fungal species present in Ecuadorian soils.

Key words: Rhizosphere, ITS, tomato, mycobiome, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*, Ecuadorian Andes

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	12
1.1.	Generalidades del tomate.....	12
1.2.	Microbioma vegetal.....	13
1.3.	Rizosfera.....	13
1.4.	Importancia del microbioma de la rizosfera	14
1.5.	Composición de microbiomas.....	14
2.	MÉTODOS.....	16
2.1.	Descripción y colecta las muestras de rizosferas.....	16
2.2.	Extracción de ADN de las rizosferas.....	16
2.3.	Secuenciación del material genético del micobioma.....	16
2.4.	Análisis bioinformático de secuencias de los micobiomas de las rizosferas de tomates nativos y modernos.....	17
2.4.1.	Preparación de las secuencias y análisis de calidad.	17
2.4.2.	Análisis diversidad.	17
2.4.3.	Análisis taxonómico.	18
2.4.4.	Abundancia diferencial.	18
2.4.5.	Agrupación de gradientes.	18
3.	RESULTADOS.....	19
3.1.	Análisis de calidad de las secuencias de rizosfera de tomate	19
3.2.	Análisis de diversidad.....	19
3.3.	Análisis taxonómico.....	20
3.4.	Prueba de abundancia diferencial.....	21
3.5.	Agrupación de gradientes.....	22
4.	DISCUSIÓN.....	23

5.	CONCLUSIONES.....	27
6.	TABLAS.....	28
7.	FIGURAS.....	29
	Referencias.....	34
	ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características estadísticas de las muestras totales secuenciadas de la rizosfera de tomate antes y después del filtrado	28
Tabla 2: Análisis de diversidad alfa y beta de las muestras de rizosfera de tomate	28

ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1: Emperor plot de Bray Curtis (a), Jaccard (b), Weighted Unifrac (c) y Unweighted Unifrac para los dos sitios (Loja y Cayambe), dos diferentes tipos de suelos (natural y agrícola), y para el tomate moderno, silvestre, y el control sin tomate.</p>	29
<p>Figura 2. Gráficos del porcentaje de filos y familias encontrados en suelos naturales y agrícolas de Cayambe y Loja, cultivados con <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker (tomate modernos) y <i>Solanum pimpinellifolium</i> (tomate silvestre), además de suelos testigos sin ningún tomate sembrado.</p>	30
<p>Figura 3. <i>Volcano plots</i> de familias encontrados en suelos naturales y agrícolas de Cayambe y Loja, cultivados con <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker (tomate modernos) y <i>Solanum pimpinellifolium</i> (tomate silvestre), además de suelos testigos sin ningún tomate sembrado, donde las familias significativas están en azul como true.</p>	31
<p>Figura 4. Mapas de calor dendrograma de sitios, tipos de suelo y tipos de tomates cultivados.</p>	32
<p>Figura 5. Gráfico de proporciones de comparación de familias encontradas en suelos naturales y agrícolas, en suelos de Cayambe y Loja y cultivados con <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker (tomate modernos) y <i>Solanum pimpinellifolium</i> (tomate silvestre).</p>	33

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Condiciones del cultivo.....	39
Anexo 2: Diseño de las muestras de rizosfera.....	40
Anexo 3: Gráficos de enrarecimiento alfa y profundidad de muestreo para los diferentes sitios, tipos de suelos y el tipo de tomate cultivado en el suelo.	41
Anexo 4: Composición del microbioma de la rizosfera del tomate sin filtrado	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del tomate

El tomate moderno, o *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker es una planta perteneciente a la familia de las Solanáceas, grupo que se estima contiene más de 3.000 especies (Gerszberg et al., 2015). Se cree que es originaria de la región Andina, desde los Andes Colombianos hasta Chile, donde aún se puede encontrar parientes silvestres (Sánchez, 2017). Ejemplos de éstos en el continente ecuatoriano son *S. neorickii*, *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*, siendo el último espécimen mencionado el más cercana al tomate moderno; mientras que en la región insular se tiene *S. cheesmaniae* y *S. galapagense* (Palacio, et al, 2016). El tomate suele estar distribuido por todas las regiones tropicales y subtropicales del país, aun cuando se cree que su territorio originario es cerca de la provincia de Loja, región con un clima subtropical-seco. (Dascon, 2018). Clima que se diferencia al encontrado en Cayambe, que se caracteriza por tener regiones boscosas, donde actualmente se existe una gran cantidad de actividades agrícolas (Chanco, 2020).

En general, el tomate es de gran importancia económica para Ecuador, con una producción anual que se estima es de 31,591 ton en un área de cosecha de 1,401 ha (FAOSTAT, 2019). De igual manera, el tomate es el segundo cultivo de hortalizas más importante a nivel mundial, luego de la papa (Hadidi et al, 2017). Esto se debe a que esta planta fue domesticada de tal forma que se volvió en un cultivo de distribución mundial (Sánchez, 2017). Además, se le conoce por tener propiedades beneficiosas para el ser humano ya que contiene licopeno, b-caroteno, flavonoides y vitamina C, así como derivados del ácido hidroxicinámico (Gerszberg et al., 2015). Del mismo modo, tiene un gran uso alimenticio en sopas, salsas, jugos y concentrados en polvo (Gerszberg et al., 2015).

Sin embargo, con su gran distribución y producción por todo el mundo, también se ampliaron los microorganismos que interactuaban con esta planta. Por una parte, se aumentaron

las relaciones benéficas como con los hongos formadores de micorrizas arbustales (Carrillo et al., 2014). Pero al mismo tiempo, se aumentaron la cantidad de enfermedades que le pueden afectar, tales como: *Botrytis cinérea*, *Oidium sp.*, *Phytophthora infestans*, *Erwinia sp.* y *Pseudomonas sp.* (Jaramillo, 2015). Lo que puede incrementar el costo de producción en un 20% para su remediación (INIAP, 2008).

1.2. Microbioma vegetal

El microbioma constituye uno de los recursos de mayor importancia que tienen los organismos para asegurar su correcto desarrollo y protección (Cordovez et al., 2019). Este está formado por un conjunto de microorganismo que residen en un entorno particular, ayudando a los organismos cercanos a realizar una gran cantidad de funciones de soporte vital (Pérez-Jaramillo et al., 2018). En el caso de las plantas, su microbioma vegetal les ayuda a desarrollarse y mantenerse sanas (Turner et al., 2013).

El microbioma de un organismo vegetal está constituido de diferentes componentes. Los cuales varían su composición de acuerdo con la etapa de desarrollo del organismo y el tipo de tejido que es estudiado, sea la microbiota de las semillas, las raíces y las hojas (Compant et al., 2019). De estas, el microbioma del suelo constituye uno de los entornos menos estudiados, aun cuando se le atribuye gran importancia dado a que se encarga de la nutrición, defensa y salud de la planta (Rivera, 2011). No obstante, el microbioma encontrado para los cultivos no es siempre el mismo, depende de las condiciones del suelo (humedad, textura, pH y disponibilidad de nutrientes) al igual que de la planta cultivada (genotipo, estrés y etapa de desarrollo) (Cordovez et al., 2019).

1.3. Rizosfera

La rizosfera es la zona del suelo de inmediato contacto con las raíces de la planta, constituida por el suelo y los diferentes tipos de tejidos vegetales colonizados por microorganismos (Chinakwe et al., 2019). Dado a su estrecho contacto con la planta, esta

región del suelo está llena de exudados provenientes de las raíces, tales como aminoácidos y azúcares, proporcionando una gran fuente de nitrógeno y de carbono (Barraza et al., 2020). Tornando esta zona del suelo en una cámara de crecimiento perfecta para una gran cantidad de diferentes microorganismos (Cordovez et al., 2019). Lo que explica, porque la rizosfera tiene tanta importancia para el estudio de los componentes del microbioma vegetal, en donde se busca expandir el conocimiento sobre la distribución y la abundancia de los microorganismos asociados a la rizosfera de las plantas (Park et al., 2005).

1.4. Importancia del microbioma de la rizosfera

El estudio del microbioma en la rizosfera nos permite conocer las relaciones benéficas o perjudiciales que puede tener una planta al interactuar con el microbioma del suelo (Rivera, 2011). El tipo de relación con las que nos encontramos es del tipo de interacción simbiótica. Por una parte, el microbioma impulsa las funciones del huésped eucariota al expandir las capacidades genéticas y metabólicas del organismo vegetal (Lee et al., 2019). Por otra parte, aumenta las capacidades nutricionales de la planta, permitiendo que ésta absorba nitrato y solubiliza el fósforo, lo que a su vez permite de forma paralela controlar los patógenos transmitidos por el suelo (Park et al., 2005). Patógenos que a su vez son componentes de la microbiota y en este caso son perjudiciales para la planta (Rivera, 2011)

1.5. Composición de microbiomas

En cuanto a la composición del microbioma de la rizosfera, estudios anteriores han estimado que entre un 71.2–74.5 % de ésta corresponde a bacterias, un 5.8–14.4% a hongos y el porcentaje restante corresponde a otros eucariotas (Dalma et al., 2019). Comparado con la cantidad de bacterias presentes en la rizosfera, la cantidad de hongos parece insignificante. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el estilo de crecimiento entre estos dos organismos es muy distinto. En comparación con las bacterias, los hongos crean micelios, que se extienden afuera de la rizosfera. Está expansión de los microorganismos fuera de la zona de exudados

juega también un rol importante en el desarrollo de la planta porque aporta beneficios de relevancia para el organismo vegetal. Entre los principales beneficios están la capacidad de suprimir patógenos y de degradar ciertos exudados, tales como sustancias poliméricas abundantes (celulosa, hemicelulosa, lignina) gracias a la producción de enzimas extracelulares (Buée et al., 2009). Sin embargo, aunque se le atribuye a este grupo de organismos una gran cantidad de capacidades benéficas, en los estudios de microbiomas, por lo general no se les tienen en cuenta o no se les dan la importancia que merecen en la rizosfera (Lee et al., 2019). Por lo tanto, se vuelve de gran relevancia el estudio del micobioma, es decir el total de la población de hongos encontrados en la zona del estudio (Cui et al., 2013).

Por lo tanto, se busca investigar a nivel molecular la diversidad taxonómica y funcional del micobioma asociado a la raíz de tomate en dos sitios de muestreo distintos, Loja y Cayambe, con dos tipos distintos de suelos naturales y agrícolas, usando al tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* y el tomate domesticado *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Se determinará la diversidad de hongos cultivables y no cultivables asociados mediante la secuenciación de la región del amplicon ITS obtenido a partir del total de material genético extraído de suelo y con ello hacer un análisis comparativo de la diversidad.

Esta clase de investigaciones se desarrollan para promover el conocimiento de la vida del suelo, cual sea una parte clave de la visión común hacia una agricultura más sostenible, donde el enfoque sea mejor mantener el balance natural en suelos agrícolas, y como resultado no depender (tanto) de pesticidas químicas para la protección de los cultivos, y utilizar menos fertilizantes artificiales para nutrir el sistema agrícola de producción.

2. MÉTODOS

2.1. Descripción y colecta de las muestras de rizosferas

Las muestras de rizosfera fueron extraídas de cultivos de tomate nativo (*S. pimpinellifolium*) y tomate moderno (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) en suelos naturales y agrícolas provenientes de las provincias de Pichincha y Loja; los mismos que posteriormente fueron cultivados dentro del invernadero de la USFQ bajo condiciones controladas (**Anexo 1**) (Chanco, 2020). Es importante recalcar que Loja se encuentra dentro del sitio de origen del tomate, y por esta razón fue seleccionada como suelo nativo de interés. Mientras que Cayambe, siendo uno de los sitios con mayor producción agrícola al nivel nacional, fue incluido como sitio control (suelo no-nativo). Los cultivos fueron extraídos del invernadero, se les realizó un corte en el cuello de la raíz que contenía suelo y se los colocó en tubos Falcon de 15 ml, con 4 ml de solución *LifeGuard Soil Preservation* (Qiagen USA), para luego almacenarlos a una temperatura de -20°C, previniendo la desnaturalización del material genético (Chanco, 2020). Se hizo el mismo procedimiento de conservación con suelo testigo sin cultivo de cada sitio y tipo de suelo. Se obtuvo un total de 80 muestras (**Anexo 2**).

2.2. Extracción de ADN de las rizosferas

El ADN se extrajo por lisis mecánica, junto al empleo del método de purificación del ADN con columnas/filtros del kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, USA), a partir de 0.05 g de suelo (Chanco, 2020). Al seleccionar este kit, se asegura mayor obtención de ADN de alta calidad purificado. Para medir la cantidad de material genético en las muestras, se usó el equipo Nanovue spectrophotometer (Chanco, 2020).

2.3. Secuenciación del material genético del microbioma

Para la secuenciación del ADN rizosférico, se utilizó el marcador molecular ITS (regiones ITS 1 y 2) con el fin de identificar y caracterizar las comunidades de hongos. La secuenciación

se realizó por la empresa Baseclear, usando la plataforma MiSeq Illumina (Leiden, Países Bajos). De la secuenciación, se generaron archivos FASTQ (*.filt.fastq.gz).

2.4. Análisis bioinformático de secuencias de los micobiotas de las rizosferas de tomates nativos y modernos

Para el análisis bioinformático en QIIME2 se usó la programación en los tutoriales “Moving Pictures” y “Differential abundance analysis with gneiss”.

2.4.1. Preparación de las secuencias y análisis de calidad.

Para el análisis de calidad de las secuencias se comenzó con la verificación de la Metada con KEEMEI en Excel. Mientras que los archivos FASTQ con datos crudos pasaron en QIIME2 por un proceso de demultiplexar, seguido de un *denoising* por DADA2, para verificar la calidad, con valores límites de la secuencia forward de 0 a 280 y de la secuencia reverse de 0 a 260. Así mismo, se realizó un filtrado de los datos obtenidos de las muestras para solo analizar secuencias de hongos para el estudio (solo taxon fungí), asegurando la obtención de los organismos de interés del micobiotas. Finalizado el paso, se exploró los datos resultantes con la opción *FeatureTable* y los resúmenes de *FeatureData*.

2.4.2. Análisis de diversidad.

Se comenzó con la determinación de la riqueza de las muestras con el análisis del gráfico de enrarecimiento alfa junto con el gráfico de visualización. Para la utilización de las variadas métricas de diversidad filogenética que Qiime2 permite realizar, se requirió alinear las secuencias para la construcción de un árbol filogenético enraizado que relacione las características entre sí. Para ello, se estableció una profundidad de muestreo uniforme de 866 frecuencia por muestra. Se realizó un análisis de alfa diversidad con los parámetros de sitio, tipo de suelo y tipo de tomate usando los índices *Faith*, *Evenness* y *Shannon*. Mientras que para la beta diversidad, se analizó con los índices *Unweighted Unifrac*, *Weighted Unifrac*, *Bray Curtis* y *Jaccard*.

2.4.3. Análisis taxonómico.

Para el estudio de la composición taxonómica se asignó una taxonomía a las secuencias de muestreo del artefacto *FeatureData* usando un clasificador para ITS previamente entrenado con *BLAST+ consensus taxonomy classifier* (Camacho et al., 2009). Al aplicar este clasificador a las secuencias, se generó una visualización del mapeo resultante en la secuenciación de la taxonomía desde los niveles de filo hasta familia.

2.4.4. Abundancia diferencial.

Para el estudio de abundancia diferencial se implementó ANCOM, con el fin de identificar las características que son diferencialmente abundantes en los grupos de muestra por sitio, tipo de suelo y tipo de tomate. Con ello se obtuvo *Volcanos plots* que fueron analizados.

2.4.5. Agrupación de gradientes.

Para la agrupación de gradientes, se creó un árbol basado en una categoría de metadatos numéricos. Con la agrupación de gradientes, se pudo juntar taxones que se encontraban en rangos similares de una categoría al nivel de familias. Con ello se creó varios árboles de jerarquía utilizando la categoría de metadatos sitio, tipo de suelo y tipo de tomate con lo que se obtuvo un total de 3 mapas de calor de dendrograma que se analizaron.

Así mismo se realizó varios diagramas de proporciones en donde se buscó identificar los taxones que podrían explicar las diferencias entre los grupos de Cayambe y Loja, al igual que entre suelo natural y agrícola. De igual forma, se realizó el mismo diagrama con los suelos sembrados con semillas de tomate moderno *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y con el tomate nativo *S. pimpinellifolium*. No se tomó en cuenta el suelo sin tomate, dado a que el objetivo era identificar si es que diferentes tipos de tomate, tiene diferentes tipos de micobiotas.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de calidad de las secuencias de rizosfera de tomate

El primer parámetro que se evaluó con respecto a las muestras, luego de demultiplexar y *denoising*, fue la calidad de las muestras y ASVs obtenidos de la secuencia de la rizosfera del tomate antes y después del filtrado para solo conservar organismos del Reino Fungi. En la **Tabla 1** se evidenció las características estadísticas de las muestras donde se identificó 6674 ASVs antes y 3419 ASVs después del filtrado. Estas se presentaron con una frecuencia promedio de 47315.82 y 32121.85 para las muestras, respectivamente, además de 567.2 y 751.61 para los ASVs. Dando un total de frecuencia 3785266 ASVs, antes del filtrado, y de 25697.5 ASVs de solo el Reino Fungi luego del filtrado.

3.2. Análisis de diversidad

En el **Anexo 3** se muestra el enrarecimiento alfa junto con la profundidad de muestreo donde parece que con el índice *Shannon* todas las curvas parecen "nivelarse" (es decir, aproximarse a una pendiente de cero) a cerca de la profundidad de 2500 de muestreo a lo largo del eje X, además de que en todas las tablas de visualización se ve que el número de muestras comienza a bajar a partir de las 15000 secuencias de profundidad. Debido a la profundidad de muestreo uniforme seleccionada, los análisis de diversidad se realizaron con 79 muestras (de las 80 muestras originales). En la **Tabla 2**, se observan los valores H, F y p de los análisis alfa y beta diversidad realizados. En cuanto a la diversidad alfa, se estudió 3 índices, *Evenness*, *Faith* y *Shannon*, para los sitios, el tipo de suelo y el tipo de tomate plantado. Con ello se identificó una alta igualdad de homogeneidad existente en las abundancias relativas de las especies en los diferentes suelos y tipos de tomates plantados, pero no entre diferentes sitios ($p=5.38 \times 10^{-11}$ y $H=43.03$). Así mismo se vio que había una diferencia en la diversidad filogenética en los diferentes sitios y tipos de suelos (con $p=0.00005$ y $p=2.28 \times 10^{-8}$ junto con valores H de 20.8 y 31.24 respectivamente) pero no entre diferentes variedades de tomate. En

cuanto a la biodiversidad específica en sitios y tipos de suelo está fue relevante con valores H superiores a 5 (42.52 y 10.41) y valores p por debajo de 0.01. No obstante, entre tipos de tomates plantados en el suelo el valor H fue de 1.95 con un valor p superior 0.01. Con los índices de la diversidad beta, por su parte, se analizó la composición de las muestras en el contexto de metadatos categóricos usando PERMANOVA probando si las distancias entre estas dentro de un grupo son más similares entre sí que a las muestras de los otros grupos. En la **Tabla 2** se encuentran los valores de relevancia de los 4 índices beta analizados para sitio, tipo de suelo, tipo de tomate y tratamiento. De acuerdo con el índice *Bray Curtis*, que explica un 56.16% de la variación se crearon cuatro grupos observables en la **Figura 1 a.**, existe una diferencia entre las abundancias de cada especie presente entre sitios y tipos de suelos con valores p menores a 0.01 y valores F altos (20.09 y 9.28), pero no entre tipos de tomates cultivado. De igual forma, el índice *Jaccard*, que explica con 4 grupos la variación del 36.38% en la **Figura 1 b.**, muestra que no existe similitud relevante entre sitios y suelos; mientras que, entre tipos de tomate plantado, si existe esta similitud. Resultados que coincidieron con los valores p y F obtenidos con los índices *Weighted* (cantidad) y *Unweighted Unifrac* (calidad), los cuales respectivamente explican 53.51% y 39.27% de la variación (**Figura 1 c. y d.**).

3.3. Análisis taxonómico

Luego de obtener el árbol filogenético enraizado, se realizó el análisis taxonómico desde el nivel de reino hasta especie. Únicamente se analizaron los resultados a nivel de filo y familia porque fue donde se encontraron los resultados más relevantes para este estudio. Además, el análisis se centró en la comunidad de los hongos, conocido como microbioma, pero no en el resto de microbioma como se ve en el **Anexo 4**. La **Figura 2** presenta el porcentaje de filos y familias encontrados en diferentes sitios con suelos distintos y tipos de tomate cultivados. En la **Figura 3.a.** se identificaron 15 filos y un conjunto de organismo fungí no identificados. De estos, el 95.53% de las ASVs del microbioma correspondían a Ascomycota,

1.95 % a Basidiomycota, 1.37 % a Mortierellomycota y 1.15% de otros filos. No obstante, los porcentajes entre Cayambe y Loja, en suelos naturales y agrícola con diferentes tipos de tomates parecen variar ligeramente en relación con los valores dados antes. Por otra parte, en la parte **b** de la **Figura 3** se identificaron un total de 182 familias y un grupo de hongos no identificados. Aunque se identificaron muchas familias de hongos, estas estaban presentes en menos del 1% del total de las muestras, por lo que se juntaron estas familias en un grupo llamado otros. Quedando con un total de 14 familias donde se observaba que el 43% eran *Chaetomiaceae*, el 14.68% eran *Stachybotryaceae*, 9.70% eran *Ascobolaceae* y 6.54% de *Nectriaceae*. No obstante, los porcentajes entre los sitios de muestreo, en suelos naturales y agrícolas con diferentes tipos de tomates parecen variar ligeramente en cuanto a los valores dados antes, así como los porcentajes comparativos entre los lugares y diferentes tipos de suelos, pero no entre el tipo de tomate plantado. En Cayambe, tanto en suelos agrícolas como naturales, las familias principales parecían ser *Chaetomiaceae*, *Stachybotryaceae* y *Ascobolaceae*. Por otro lado, en Loja, en los suelos agrícolas se encontraron *Chaetomiaceae*, *Nectriaceae*, *Aspergillaceae* y *Pleoporaceae*; mientras que en el suelo natural, las principales familias presentes fueron una agrupación de hongos desconocidos, además de *Chaetomiaceae* y *Nectriaceae*.

3.4. Prueba de abundancia diferencial

La **Figura 3** visualiza los *Volcano plots* de los grupos de muestras divididos por sitio, tipo de suelo y tipo de tomate sembrado en el suelo a nivel de familias. A partir de esta visualización se distingue que hay más características que son diferencialmente abundantes entre Cayambe y Loja. Le sigue las características diferencialmente abundantes por el tipo de suelo (natural y agrícola). Mientras que la que existe menor cantidad de características diferencialmente abundantes entre los diferentes tipos de tomates cultivados, donde solo se diferencia dos grupos.

3.5. Agrupación de gradientes

A partir de los árboles de jerarquía, obtenidos con la agrupación de gradientes juntando taxones que se encontraban en rangos similares de una categoría de metadatos al nivel de familia, se obtuvieron los mapas de calor de dendrograma, observados en la **Figura 4**, para los diferentes sitios, tipos de suelo y tipos de tomates que fueron plantados en el suelo. De manera general, en los dos lugares se encontraron los mismos grupos, pero lo que varía es la abundancia de las familias de hongos presentes en cada lugar. Las familias *Aspergillaceae*, *Pleosporaceae* y *Mortierellaceae* estaban más presentes en los suelos naturales de Cayambe que en los suelos agrícolas. Mientras que en el caso de Loja en suelos naturales estaban presentes las familias *Ascobolaceae* y *Mortierellaceae*; en tanto que en el suelo agrícola estaba más presente la familia *Pleosporaceae*. Sin embargo, las principales diferencias se distinguían entre los suelos nativos y suelos agrícolas de los dos lugares, como es el caso de las familias de *Pleosporaceae* y *Aspergillaceae* que son poco abundantes en los suelos agrícolas de Cayambe, pero son abundantes en los suelos agrícolas de Loja. Por otra parte, se identificó gran abundancia del grupo *Stachybotryaceae* en ambos tipos de suelos de Cayambe; pero este grupo casi no estaba presente en los suelos de Loja. En la **Figura 5** se observan los mismos patrones antes explicados. Entre los suelos de Cayambe y Loja, existían diferencias con la proporción de familias *Stachybotryaceae*, *Ascobolaceae*, *Aspergillaceae*, *Nectriaceae*, grupos de Ascomycota no identificados y otros, siendo las dos primeras familias más abundantes en Cayambe que en Loja. Entre los suelos de naturales y agrícolas existía diferencia entre las familias *Chaetomiaceae*, *Stachybotryaceae* y no identificados, con los dos últimos más presentes en el suelo natural. Finalmente, entre los tomates de variedad silvestre y moderno, la diferencia de proporciones fue casi igual entre las dos variedades, sólo se identificó una mínima diferencia con los grupos *Stachybotryaceae* y *Ascobolaceae*.

4. DISCUSIÓN

Este estudio es uno de los primeros que busca explorar la población de hongos de la rizosfera asociado al tomate nativo *Solanum pimpinellifolium* en un suelo nativo como hábitat natural del tomate y en un suelo moderno agrícola de la zona de Loja, comparando los resultados obtenidos con tomates modernos cultivados en suelo no-nativo y agrícola de Cayambe.

Debido a ello, fue importante el llevar a cabo un análisis de calidad de las secuencias estudiadas para asegurar que los procesos de demultiplexear, *denoising* mediante DADA2 y filtrado, que buscaban asegurar que solo ASVs del Reino Fungi estén presentes, no dejaran pocas muestras con información limitada. Con los tres procesos se identificó una disminución de cantidad de secuencias y ASVs identificados. No obstante, fue con el filtrado donde hubo la mayor disminución, al punto que la cantidad de ASVs disminuyó a la mitad (**Tabla 1**). Debido a esta drástica disminución fue de vital importancia el determinar la riqueza de muestras analizando los gráficos de rarefacción de alfa diversidad junto con los gráficos de visualización de las tres variables (**Anexo 3**). En todos los gráficos de rarefacción, las líneas de los gráficos parecían nivelarse cerca de la profundidad de secuencia de 2500, sugiriendo que secuencias adicionales más allá de esa profundidad de muestreo probablemente no resulten en características adicionales. Resultados que fueron verificados por la gráfica de visualización, donde se distingue el número de muestras que quedan en cada grupo, cuando la tabla de características se enrarece para cada profundidad de muestreo. De esta forma, se verifica que la información del gráfico de alfa rarefacción es fiable, que la cantidad de secuencias recolectadas era suficiente y que no existían errores de secuenciación (Estaki et al., 2020).

Con todos los índices de diversidad alfa (**Figura 1** y **Tabla 2**), se pudo observar un patrón común entre las muestras. Existían diferencias entre los ASVs de Loja y Cayambe, además de que dentro de Loja se encontraba los ASVs claramente divididos entre suelo del tipo natural y

agrícola. Observaciones que fueron verificadas por los altos valores H y bajos valores p entre los diferentes sitios y diferentes tipos de suelos, pero no entre tipos de tomates plantado. En los sitios, se mostró que existía una alta igualdad (*evenness*) entre Cayambe y Loja, al igual que hubo una alta diversidad entre los tipos de suelo y un valor de PD significativo, por lo que los ASVs identificados entre los dos lugares son lejanos evolutivamente. Entre los tipos de suelos, el valor de igualdad no fue significativo, pero si tenía un alto valor *Faith* y *Shannon*, evidenciando que, entre los tipos de suelos, los ASVs son evolutivamente lejanos con una gran riqueza de diversidad. No obstante, entre los tipos de tomates sembrados no todos los parámetros alfa fueron no significativos por lo que no había igualdad, riqueza de diversidad y tampoco era lejanos en términos evolutivos. En la diversidad beta, estos patrones se intensifican aún más mostrando que existen diferencias significativas entre los suelos de Cayambe y Loja, entre los suelos del tipo natural y de agricultura, pero no entre variedades de tomates. Esto nos lleva a pensar que las diferencias encontradas se deben no al tipo de tomates usados sino a la composición de los suelos que influyen el crecimiento de los hongos, la cual difería entre las dos regiones y los dos tipos de suelos usados. Un ejemplo de esto es la cantidad de nitrógeno y potasio encontrado en los dos tipos de suelo de Cayambe comparado con Loja, que puede tener un papel clave en la composición de la comunidad de hongos (Chanco, 2020).

Al realizar el análisis de diversidad (**Figura 2**), contrario a lo que se esperaba, no se encontró mayores diferencias entre las muestras de rizosferas cultivadas con diferentes tipos de tomates o en el caso del suelo testigo sin siembra de tomate. Se identificó un cambio de la diversidad entre el tipo de suelo y el sitio de donde éste provenía. Al analizar los filos esta diferencia, no era fácil de observar entre los sitios de Cayambe y Loja, o incluso entre los suelos naturales y agrícolas. Para todos estos suelos parecía que la mayoría de los ASVs, más del 95%, pertenecían al filo Ascomycota. En este grupo se pudieron identificar hongos como: Plectomycetes, Discomycetes, Pyrenomycetes y Loculoascomycetes, los cuales pueden ser de

utilidad para la descomposición de sustratos orgánicos y actúan como mutualistas, parásitos y patógenos de plantas y otros hongos (Schoch et al., 2009). Estos resultados no concuerdan con una investigación de la rizosfera de tomate realizada en México donde se encontró que, aunque el filo Ascomycota era el mayoritario de la región, su porcentaje no era superior al 59% (Cordero-Ramírez et al., 2012). Esta diferencia se podría deber a la época en la cual fueron recogidas las muestras (noviembre), que es la época seca para las dos regiones y que podría favorecer la presencia de Ascomycota en la región. Por esta razón, antes de la serie de experimentos en el invernadero de Quito, se empezó con un tratamiento de reactivación de la actividad microbiana del suelo. No obstante, al indagar más profundamente en la diversidad, enfocándonos en las familias, se distinguió que existe una diferencia clara en la composición del microbioma de la rizosfera estudiada, en especial en Loja. Tanto en los suelos natural y agrícola de los dos sitios, la familia *Chaetomiaceae* estaba presente. Esto se debe a que este grupo de hongos tiene el género más grande de Ascomycetes con más de 300 especies en todo el mundo; y por lo general, tienen la capacidad de degradar celulosa y otros materiales orgánicos usando enzimas líticas (Phong et al., 2016). Mientras que en Cayambe se vio más presente a *Stachybotryaceae*, que es resistente a altas temperaturas, a la alta exposición a la luz y que puede desarrollarse en entornos pobres de nutrientes. También en Cayambe se encontró *Ascobolaceae* que tiene una correlación positiva con la deshidrogenasa del suelo, la invertasa y la fosfatasa alcalina, dando así beneficios a las plantas de estos suelos (Oliveira et al., 2020; Ghani et al., 2019). Las familias de hongos más presentes en Loja fueron *Nectriaceae* y *Aspergillaceae*, que son beneficiosas en suelos con déficit hídrico dada su alta tolerancia a este tipo de ambiente y estrés, gracias a la producción de metabolitos (Fuentes et al., 2020). Otro grupo que estuvo muy presente en Loja fue *Pleosporaceae* en suelos agrícolas, pero no se pudo determinar su funcionalidad al igual que en los grupos no identificados (suelos naturales).

En la **Figura 3** se visualiza los tres *Volcano Plots* de los grupos de muestra por los parámetros de sitio, tipo de suelo y tipo de tomate cultivado en el suelo, al nivel de familias. Se distingue que existe mayor cantidad de abundancia diferencial entre Cayambe y Loja con una gran cantidad de grupos los cuales fueron difíciles de identificar. Le sigue los diferentes tipos de suelo en donde hubo seis grupos diferenciales. Mientras que, entre diferentes tipos de tomates cultivados, la abundancia diferencial apenas se distingue tres ASVs. Con los mapas de calor (**Figura 4**) se distinguió que entre los dos lugares existe los mismos grupos similares pero la abundancia de esto es lo que les diferencia. Entre los grupos con los cuales se distinguió esta diferencia se encuentra *Stachybotryaceae*, *Pleosporaceae* y *Aspergillaceae*. Siendo el primer grupo que tiene mayor presencia en Cayambe donde plagas del tomate se encuentran, tal como *Stachybotrys microspora* o *Stachybotrys palmicola* (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2021). Mientras que con *Aspergillaceae*, más presente en Loja, como se explicó antes se encuentra organismos con tolerancia al déficit hídrico (Fuentes et al., 2020). Finalmente, con la **Figura 5** se identifican las proporciones diferenciales más relevantes como fue con los anteriores resultados, la mayor diferencia se vio entre las dos ubicaciones seguido por los tipos de suelos. Mientras que entre tipos de tomates esta diferencia fue casi no visible. Sin embargo, dado a que en muchos casos no se pudo llegar al nivel de especies, solo hasta género o familia muy difícilmente se pudo determinar cuáles fueron las diferencias entre grupos y cuáles era las distinciones de cada grupo. Esto evidencia, la importancia de tener más investigaciones hacia las comunidades de hongos asociados a las raíces de los parientes ancestrales de cultivos de importancia económica, como los tomates, con el fin de generar más conocimiento de la vida del suelo, y posiblemente descubrir el potencial de especies de hongos benéficos que co-evolucionaron durante la evolución y especiación de los tomates silvestres ancestrales en su centro de origen en la región Andina en el sur de Ecuador.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, al ser el tomate una planta de gran importancia económica es de gran relevancia el poder buscar alternativas al uso de herbicidas y pesticidas para el aumento de producción y para la resistencia al daño abiótico y biótico. Lo que ha llevado a que se empiece a investigar sobre el microbioma. En especial, las comunidades de hongos denominado el microbioma de la rizosfera del tomate nativo, *Solanum pimpinellifolium*, que ha mostrado ser más resistente que su contraparte moderna, *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker.

Contrario a lo planteado en la hipótesis, la diferencia de composición de hongos en los suelos no fue influenciada por el tipo de tomate, pero por su composición microbiana inicial. Por ello, se distinguen claras diferencias de composición de ASVs entre los suelos provenientes de las localidades de Cayambe con los de Loja, y entre suelos naturales y suelos agrícolas. Estas diferencias fueron dadas por las familias *Chaetomiaceae*, *Stachybotryaceae*, *Ascobolaceae*, *Nectriaceae*, *Aspergillaceae*, *Pleosporaceae* y grupos no identificados.

A pesar de que se encontró que existen diferencias, debido al poco estudio que se tiene en la actualidad respecto a los suelos de Ecuador y la comunidad fúngica, fue complejo el poder determinar a nivel de las especies. El nivel de mayor análisis que se logro fue el de familias. Sin embargo, se espera que en el futuro se realicen más investigación para poder caracterizar la funcionalidad de los ASVs identificados en cada una de las muestras estudiadas.

6. TABLAS

Tabla 1: Características estadísticas de las muestras totales secuenciadas de la rizosfera de tomate antes y después del filtrado

	Antes del filtrado		Después del filtrado	
	Cantidad		Cantidad	
	Muestra	ASVs	Muestra	ASVs
Conteo	80	6674	80	3419
	Frecuencia		Frecuencia	
	Muestra	ASVs	Muestra	ASVs
Mínimo	4252.0	1.0	865.0	2.0
Mediana	48405.0	9.0	31.7	13.0
Máxima	59369.0	537161.0	55384.0	537161.0
Promedio	47315.8	567.2	32121.9	751.6

Tabla 2: Análisis de diversidad alfa y beta de las muestras de rizosfera de tomate

Diversidad	Alpha						Beta							
	Evenness		Faith		Shannon		Bray Curtis		Jaccard		Weighted Unifrac		Unweighted Unifrac	
Test Estadístico	H	Valor P	H	Valor P	H	Valor P	F	Valor P	F	Valor P	F	Valor P	F	Valor P
Sitio	43.03	5.38×10^{-11}	20.8	0.00005	42.52	6.9×10^{-11}	21.93	0.001	17.92	0.001	19.26	0.001	20.11	0.001
Tipo de suelo	3.66	0.06	31.24	2.28×10^{-8}	10.41	0.001	9.16	0.001	7.71	0.001	14.87	0.001	9.03	0.001
Tipos de tomates	2.3	0.32	2.9	0.23	1.95	0.38	0.80	0.62	0.95	0.51	1.25	0.22	1.30	0.15

7. FIGURAS

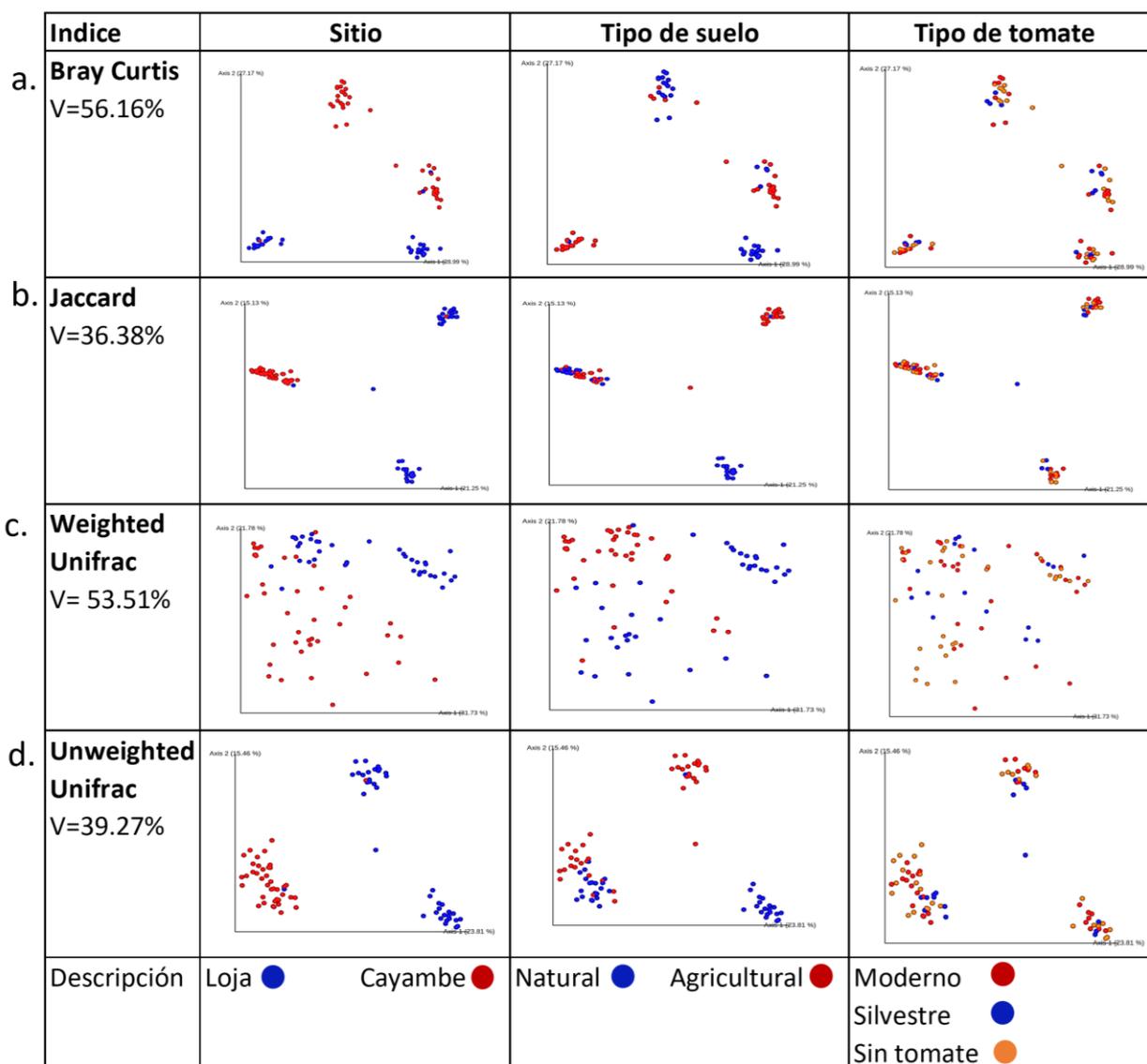


Figura 1: Emperador plot de *Bray Curtis* (a), *Jaccard* (b), *Weighted Unifrac* (c) y *Unweighted Unifrac* para los dos sitios (Loja y Cayambe), dos diferentes tipos de suelos (natural y agrícola), y para el tomate moderno, silvestre, y el control sin tomate.

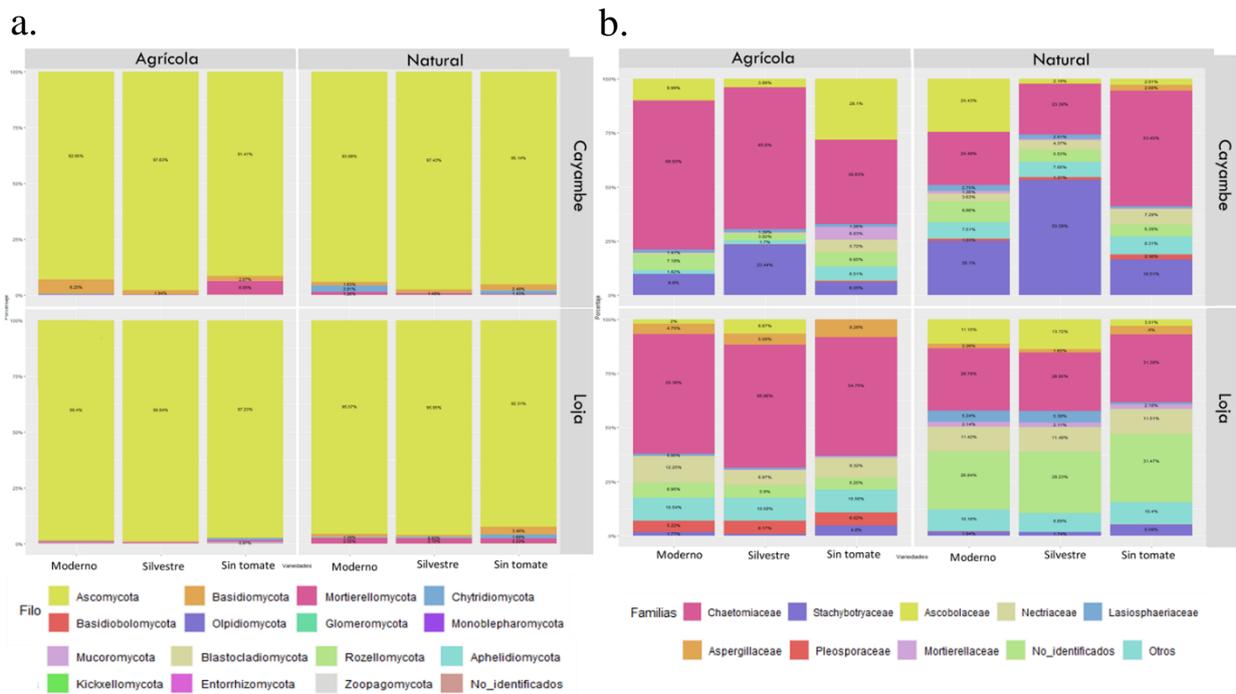


Figura 2. Gráficos del porcentaje de filos y familias encontrados en suelos naturales y agrícolas de Cayambe y Loja, cultivados con *Solanum lycopersicum* cv. *Moneymaker* (tomate moderno) y *Solanum pimpinellifolium* (tomate silvestre), además de suelos testigos sin ningún tomate sembrado.

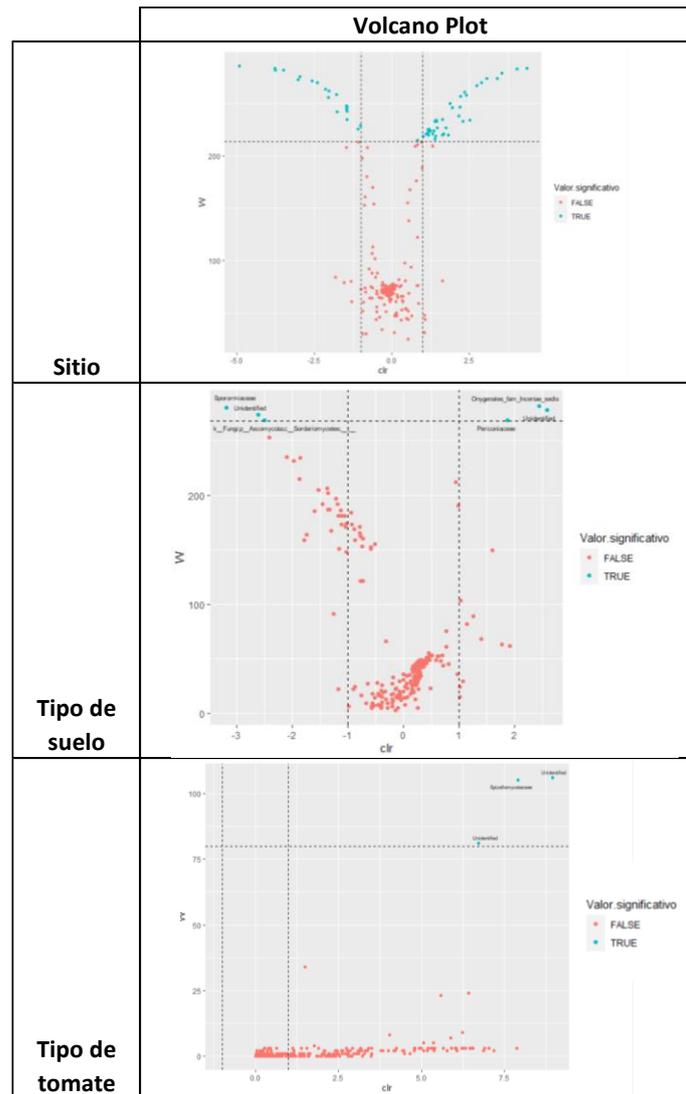


Figura 3. *Volcano plots* de familias encontrados en suelos naturales y agrícolas de Cayambe y Loja, cultivados con *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (tomate moderno) y *Solanum pimpinellifolium* (tomate silvestre), además de suelos testigos sin ningún tomate sembrado, donde las familias significativas están en azul como *true*.

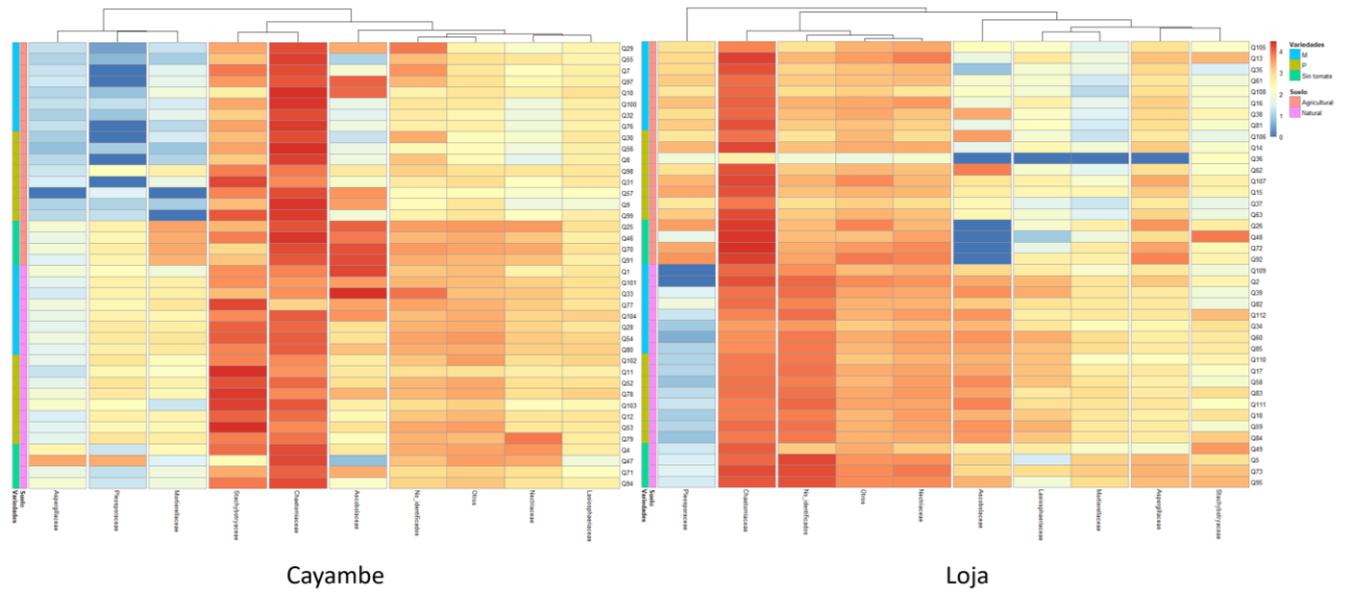


Figura 4. Mapas de calor Dendrograma de sitios, tipos de suelo y tipos de tomates cultivados.

REFERENCIAS

- Antoniou, A., Tsolakidou, M.-D., Stringlis, I. A., & Pantelides, I. S. (2017). Rhizosphere Microbiome Recruited from a Suppressive Compost Improves Plant Fitness and Increases Protection against Vascular Wilt Pathogens of Tomato. *Rhizosphere Microbiome and Vascular Wilts*, 1-16.
- Barraza, A., Caamal-Chan, M. G., Castellanos, T., & Loera-Muro, A. (2020). Bacterial community characterization of the rhizobiome of plants belonging to Solanaceae family cultivated in desert soils. *Annals of Microbiology*, 1-14.
- Bedinger, P. A., Chetelat, R. T., McClure, B., Moyle, L. C., Rose, J. K., Stack, S. M., . . . Royer, S. (2010). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reproduction*, 1-17.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 478-486.
- Boer, W. d., Folman, L. B., Summerbell, R. C., & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 795–811.
- Buée, M., Boer, W. D., Martin, F., Overbeek, L. v., & Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil*, 189-212.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden. (2009) T. Blast+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*. doi:10.1186/1471-2105-10-421.

- Carrillo, M. A., Franco, A. D., Peña del Río, M. (2014). Productividad de tomate mediante micorriza arbuscular en agricultura protegida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 513-518
- Causse, G. B. (2012). *Genetic Diversity in Tomato (Solanum lycopersicum) and Its Wild Relatives*. Istanbul: Genetic Diversity in Plants.
- Chanco, P. (2020). *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*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Chinakwe, E., Ibekwe, V., Nwogwugwu, U., Onyemekara, N., Ofoegbu, J., Mike-Anosike, E., . . . Chinakwe, P. (2019). Microbial Population Changes In The Rhizosphere Of Tomato Solanum Lycopersicum Varieties During Early Growth In Greenhouse. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture*, 23-27.
- Compant, S., Samad, A., Faist, A., Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*. 29-37
- Cordero, J., Rivera, R., Calderón, C., Figueroa, A., Martínez, J., Levy, 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. J., & Raaijmakers, J. M. (2019). Ecology and Evolution of Plant Microbiomes. *Annual Review of Microbiology*, 3.1–3.20.
- Cui, L., Morris, A., Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome Medicine*. 2-12

- Dalma, K. E., Teodor, R., Lech, W. S., Haydee, K. M., Di, T., & Cecilia, R. (2019). Rhizosphere microbiota profile changes with different genetic types of tomato species. *Agricultura*, 140-150.
- Dascon, A. (2018). *Evaluación de cinco variedades de tomate (solanum lycopersicum l.) obtenidas usando germoplasma nativo ecuatoriano frente a dos tratamientos de control de plagas, en la provincia de Loja*. Azuay: Universidad de Azuay.
- Delgado-Vargas, V. A., Magdaleno-Villar, J. J., Ayala-Garay, Ó. J., & Garfias-Sánchez, D. (2018). Calidad de semillas de tres variedades nativas y una comercial de tomate producidas bajo temperaturas altas. *Revista Chapingo*, 215-227.
- Estaki, M., Jiang, L., Bokulich N. A., McDonald, D., González, A. Kosciolk, T., Martino, C. Zhu, Q., Birmingham, A., Vázquez-Baeza, Y., Dillon, M. R., Bolyen, E., Caporaso, J. G., Knight, R. (2020). QIIME 2 Enables Comprehensive End-to-End Analysis of Diverse Microbiome Data and Comparative Studies with Publicly Available Data. *Current Protocols in Bioinformatics*. 1- 46.
- FAOSTAT. (2019). Cultivos. FAO. Recuperado el 12 de mayo de 2021 de <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC>
- Fuentes, A., Herrera, H., Charles, C. & Arriagada, C. (2020). Fungal and Bacterial Microbiome Associated with the Rhizosphere of Native Plants from the Atacama Desert. *Microorganism*. 2-14.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 881–902.
- Ghani, M. I., Ali, A., Atif, M. J., Ali, M., Amin, B., Anees, M., Khurshid, H., & Cheng, Z. (2019). Changes in the Soil Microbiome in Eggplant Monoculture Revealed by High-Throughput Illumina MiSeq Sequencing as Influenced by Raw Garlic Stalk

- Amendment. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2125.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092125>
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., & Palukaitis, P. (2017). *Viroids and Satellites*. San Diego: Academic Press.
- INIAP. (2008). *Guía Técnica de Cultivos (Aida Villavicencio, Wilson Vásquez ed.)*. Quito: INIAP.
- Jaramillo, J.F. (2015). *Evaluación agronómica del cultivo de tomate (Solanum lycopersicum) bajo tres diferentes coberturas plásticas*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Lee, S., Kim, Y., Kim, J. M., BoraChu, Joa, J.-H., Sang, M. K., . . . Hang-YeonWeon. (2019). A preliminary examination of bacterial, archaeal, and fungal communities inhabiting different rhizocompartments of tomato plants under real-world environments. *Scientific Reports*, 1-15.
- Oliveira, T., Lucas, R., Scarcella, A. S., Contato, A., Machado, T., Martinez, C., & Polizeli, M. (2020). Fungal communities differentially respond to warming and drought in tropical grassland soil. *Molecular Ecology*. 1550–1559.
- Palacio, M. N., Astudillo, Á. R., Valor, A. A., García, Y. M., & López, G. E. (2016). Caracterización fenotípica y genética de cuatro especies silvestres del género *Solanum*, sección *Lycopersicon*. *Cultivos Tropicales*, 109-119.
- Park, M. S., Jung, S. R., Lee, M. S., Kim, K. O., Do, J. O., Lee, K. H., . . . Bae, K. S. (2005). Isolation and Characterization of Bacteria Associated with Two Sand Dune Plant Species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *The Microbiological Society of Korea*, 219-227.
- Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., Hollander, M. d., & Raaijmakers, J. M. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 1-6.

- Phong, N., Pongnak, W. & Soyong, K. (2016). Antifungal Activities of *Chaetomium* spp. against Fusarium Wilt of Tea. *Plant Protection Science*. 10-17.
- Rivera, R. L. (2011). *Biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies solanáceas: Solanum lycopersicon, L. y Datura spp. (tomate y toloache)*. Sinaloa: El Instituto Politécnico Nacional.
- 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*. València: Universitat Politècnica de València.
- Schoch, C., Sung, G., López-Giráldez, F., Townsend, J., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R., Trippe, K., Ciufetti, L., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B., Bonito, G.,, and Spatafora, J. (2009). The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic Biology*. 224–239
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. (2021). Recuperado el 12 de mayo de 2021 de <https://www.sinavimo.gob.ar/plagas/pratylenchus-spp?page=133>
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 1-10.

ANEXOS**ANEXO 1: CONDICIONES DEL CULTIVO**

Condiciones	
Luz	12h luz/12h oscuridad
Temperatura	$\geq 22^{\circ}\text{C}$
Tiempo de riego	Cada 1 a 2 días
Cantidad de agua regada	5-25 ml

ANEXO 2: DISEÑO DE LAS MUESTRAS DE RIZOSFERA

Sitio	Tipo de suelo	Tipo de tomate cultivado
Cayambe, Pichincha	Moderno	Moneymaker
		<i>S. pimpinellifolium</i>
		Sin tomate
	Nativo	Moneymaker
		<i>S. pimpinellifolium</i>
		Sin tomate
Loja, Loja	Moderno	Moneymaker
		<i>S. pimpinellifolium</i>
		Sin tomate
	Nativo	Moneymaker
		<i>S. pimpinellifolium</i>
		Sin tomate

ANEXO 3: GRÁFICOS DE ENRARECIMIENTO ALFA Y PROFUNDIDAD DE MUESTREO PARA LOS DIFERENTES SITIOS, TIPOS DE SUELOS Y EL TIPO DE TOMATE CULTIVADO EN EL SUELO

	Descripción	Enrarecimiento alfa	Profundidad de muestreo
Sitio	Cayambe ● Loja ●		
Tipo de suelo	Natural ● Agricultura ●		
Tipo de tomate	M ● P ● Sin tomate ●		

ANEXO 4: COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA DE LA RIZOSFERA DEL TOMATE

SIN FILTRADO

