

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación del potencial del microbioma del tubérculo de papa
nativa (*Solanum phureja*) contra *Rhizoctonia solani***

Miguel Antonio Pazmiño Vela

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

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

**Evaluación del potencial del microbioma del tubérculo de papa nativa
(*Solanum phureja*) contra *Rhizoctonia solani***

Miguel Antonio Pazmiño Vela

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, PhD

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: Miguel Antonio Pazmiño Vela

Código: 00138426

Cédula de identidad: 1723476568

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

La papa nativa (*Solanum phureja*) es un tubérculo de alto interés comercial en Ecuador, que es susceptible a la costra negra causada por *Rhizoctonia solani*. Éste produce manchas oscuras en la piel de las papas que reducen su atractivo comercial y es difícil de controlar de forma convencional. Ya que el microbioma vegetal está asociado al crecimiento y salud, se han buscado nuevos biocontroladores en su endosfera. Así, se evaluó el potencial del microbioma del tubérculo de papa nativa (*S. phureja*) contra *R. solani*. Para esto, se plantaron 2 variedades “chaucha amarilla” y “chaucha ratona” en suelo nativo y en este suelo bajo tratamiento térmico (T: 121°C por 1 hora). A la vez que se secuenció las regiones V3-V4 del 16S ARNr (bacterias) y el ITS2 (hongos). Además, se aisló bacterias endófitas del tubérculo para ensayos de screening de inhibición. En la literatura, se encontró que solo 6 estudios usan variedades nativas, solo 2 exploran el tubérculo y 1 único estudio se realizó en Sudamérica. También, se encontró que el microbioma de tubérculo es menos diverso que el suelo. Donde los filos dominantes en papa fueron Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, junto a los órdenes Archaeorhizomycetales y Saccharomycetales. Aparte, el tratamiento térmico redujo la diversidad del suelo. Cuando plantas se cultivaron en suelo T, las comunidades bacterianas del tubérculo mostraron dominancia casi total de Proteobacteria. Finalmente, se evaluaron 106 endófitos bacterianos contra *R. solani*. Se encontró que 18 tenían potencial inhibitorio, donde 12 eran de tubérculos de suelo nativo y solo 6 eran de suelo T. En conclusión, se encontró que no se ha estudiado el microbioma de tubérculo nativo en su centro de origen. También que la reducción en la diversidad del suelo puede producir un ensamblaje anormal del microbioma del tubérculo que incluye menos endófitos con potencial de controlar a *R. solani*.

Palabras clave: *Solanum phureja*, *Rhizoctonia solani*, microbioma del tubérculo, endófitos, potencial inhibitorio, biocontrol, diversidad.

ABSTRACT

Native potato (*Solanum phureja*) is a root vegetable of high commercial interest in Ecuador, that is susceptible to black scurf caused by *Rhizoctonia solani*. This pathogen produces black spots on the skin surface that give an undesirable appearance that reduces value and is hard to control through conventional means. As the plant microbiome is related to growth and health, new biocontrol agents have been explored in the endosphere. Therefore, we evaluated the control potential of the tuber microbiome of native potato (*S. phureja*) against *R. solani*. For this purpose, we sowed 2 varieties “chaucha amarilla” and “chaucha ratona” in native soil and the same soil subjected to heat treatment (T: 121°C for 1 hour). As well as we sequenced the V3-V4 regions of the 16S rRNA (bacteria) and the ITS2 region (fungi). Besides, we isolated endophytic tuber bacteria for screening inhibition potential. In the literature we found that only 6 studies used native varieties, only 2 explored the tuber and only 1 study was conducted in South America. Also, that the tuber microbiome is less diverse than the soil. Moreover, the most dominant phyla in the tuber are Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria, and the fungal orders Archaeorhizomycetales and Saccharomycetales. On the other hand, the heat treatment reduced diversity in the soil. When plants were sown in T soil, the tuber bacterial communities displayed Proteobacteria dominance. Finally, 106 bacterial endophytes were screened for inhibition against *R. solani*. We found that 18 isolates had inhibition potential, where 12 came from tubers in N soil, while only 6 came from T soil. To sum up, we found few to no studies on the tuber microbiome of native varieties on its center of origin. While the reduction of diversity in the soil could produce an aberrant microbiome assemblage in the tuber that harbors fewer endophytes with the potential to control *R. solani*.

Key words: *Solanum phureja*, *Rhizoctonia solani*, tuber microbiome, endophytes, inhibition potential, biocontrol, diversity.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN	10
MÉTODOS	14
Revisión sistemática de literatura	14
Cultivo de papas, colección de muestras, desinfección y almacenamiento	14
Concentración y aislamiento de endófitos	15
Extracción de ADN y secuenciamiento	15
Procesamiento y análisis de datos.....	16
Bioensayos de screening de inhibición contra <i>Rhizoctonia solani</i>	16
RESULTADOS.....	17
Revisión sistemática de literatura	17
Microbioma de plantas de papa sanas y su uso para controlar enfermedades	17
Microbioma de papas nativas cultivadas en suelo andino	18
Alteración del microbioma del suelo nativo por tratamiento térmico	19
Alteraciones del microbioma de tubérculos de plantas cultivadas en suelo nativo sometido a tratamiento térmico	19
Potencial inhibitorio <i>in vitro</i> de endófitos bacterianos de tubérculos de plantas de suelo nativo y de tubérculos de plantas de suelo bajo tratamiento térmico	20
DISCUSIÓN	21
Importancia de los estudios de microbiomas vegetales nativos en sus centros de origen ...	21
El microbioma del suelo es más diverso y da origen al microbioma del tubérculo.....	21
El suelo T como modelo de suelos agrícolas y su impacto en la diversidad microbiana ...	22
La reducción de la diversidad bacteriana de suelo y tubérculo afecta el potencial de defensa de las plantas frente a <i>R. solani</i>	23
Potencial inhibitorio de microbiomas más diversos: Consideraciones y limitaciones	24
CONCLUSIONES.....	25
TABLAS	26
FIGURAS	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de la literatura sobre el uso del microbioma de papa para controlar enfermedades.....	26
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA del proceso sistemático de revisión de literatura.....	28
Figura 2. Resumen de las características de los 20 estudios relacionados con el microbioma de plantas de papa sanas.....	30
Figura 3. Diversidad α , diversidad β y composición de las comunidades bacterianas y fúngicas de plantas de papa cultivadas en suelo nativo	32
Figura 4. Diversidad α , diversidad β y composición de las comunidades bacterianas y fúngicas de suelo nativo y de suelo nativo bajo tratamiento térmico.....	34
Figura 5. Diversidad α , diversidad β y composición de las comunidades bacterianas y fúngicas de tubérculos obtenidos de plantas cultivadas en suelo nativo y de tubérculos obtenidos de plantas cultivadas en suelo nativo sometido a tratamiento térmico.....	36
Figura 6. Resultados de los bioensayos de screening <i>in vitro</i> del potencial inhibitorio de los endófitos bacterianos de tubérculos de suelo nativo y de suelo nativo bajo tratamiento térmico.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. METODOLOGÍA EXTENDIDA.....	45
ANEXO 2. EJEMPLOS DE CULTIVOS PUROS DE BACTERIAS ENDÓFITAS AISLADAS DE LOS TUBÉRCULOS DE SUELO N Y DE SUELO T	48

INTRODUCCIÓN

La papa está dentro de la familia Solanaceae y del género *Solanum*. Éstas son plantas herbáceas, dicotiledóneas, con hojas compuestas y que generan flores pentámeras de diversos colores. Pueden crecer hasta 1 metro de altura, y su característica particular es la formación de tubérculos comestibles, los cuales son tallos subterráneos modificados que se originan de estolones (FAO, 2008). Además, las papas se pueden reproducir sexualmente por medio de la producción de semillas o vegetativamente para generar plantas genéticamente idénticas a la planta madre, mediante los tubérculos (CIP, s.f.). Con respecto a su historia, las papas fueron domesticadas en los Andes en Sudamérica hace al menos 7000 años por lo que éste es su centro de origen y de diversidad. Mientras que fue introducida en Europa en el siglo XVI durante la conquista española, y se comenzó a cultivar alrededor del mundo con fines alimenticios a partir de finales del siglo XVIII (FAO, 2008; Hermanová, et al., 2007; Noroña y Tipanquiza, 2010).

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial después del trigo, maíz y arroz. Se producen alrededor de 370 millones de toneladas de papas anualmente en todo el mundo, siendo China, India, la Federación Rusa y Estados Unidos los mayores productores (Bradshaw y Ramsay, 2016; CIP, s.f.; FAO, 2019). Su importancia se debe a que es una fuente principal de carbohidratos por su alto contenido de almidón, provee proteínas, vitaminas C, B1 y B6, nutrientes como el P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, es rica en fibra y contiene compuestos antioxidantes. Es por esto que corresponde a una parte importante de la seguridad alimentaria inclusive en países en vías en desarrollo, particularmente en regiones de gran altitud (CIP, s.f.; Zhang, et al., 2017). En Ecuador se cultivan alrededor de 275 mil toneladas anuales de papa, donde también sirve como fuente de ingresos para las comunidades rurales de la Sierra. Esto se debe a que se produce en todas las provincias de la

Sierra, a la vez que el consumo anual per cápita en las principales ciudades es de 122 kg en Quito, 80 kg en Cuenca y 50 kg en Guayaquil. Cabe recalcar que aquí la papa se consume principalmente en estado fresco, y también procesada como papas fritas, congeladas y enlatadas (FAO, 2019; Pumisacho y Sherwood, 2002).

Solanum tuberosum es la especie tetraploide adaptada a días cortos (4n) más conocida y comercializada, que incluye a *S. tuberosum* subsp. *andigena* y *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. La primera es una papa de los Andes que mediante cruzamientos consiguió este nivel de ploidía y que está adaptada a días cortos. Mientras que la segunda proviene de una papa originaria de Chile que mediante cruzamientos desarrolló un genoma 4n adaptado a días largos, lo que le permitió ser cultivada en varias regiones del hemisferio norte. Otras especies de los Andes incluyen a la papa criolla *S. phureja*. Ésta pertenece al complejo de 20 especies llamado *Solanum brevicaule*, que tiene un genoma diploide (2n) y no tiene etapa de dormancia (Bradshaw y Ramsay, 2016; Hermanová, et al., 2007; Noroña y Tipanquiza, 2010). Esta especie resulta interesante porque cuenta con resistencia a patógenos comunes de *S. tuberosum* como el oomiceto *Phytophthora infestans*, por lo que se puede aprovechar en programas de cruzamientos (Escallón, et al., 2005; Machida, 2015). En Ecuador podemos encontrar las variedades chaucha amarilla y chaucha ratona que se cultivan con frecuencia. La primera se produce principalmente en Chimborazo, el tubérculo es amarillo por dentro y fuera produciendo cerca de 13 tubérculos (Monteros et al., 2010). Mientras que chaucha ratona se produce en Carchi, el tubérculo tiene piel morada e interior amarillo con manchas moradas y puede producir alrededor de 30 tubérculos (Pantoja, 2013). Adicionalmente, cabe mencionar que las variedades de papas se pueden clasificar en tres tipos: mejoradas que han sido seleccionadas por cruzamientos, nativas o “landrace” que se han seleccionado por cultivo y no cruzamientos, y las silvestres que no han sido cultivadas (Monteros y Reinoso, 2010).

Debido a la importancia del cultivo de papas, es indispensable conocer sobre enfermedades que la afectan como la costra negra causada por *Rhizoctonia solani*. Éste es un hongo patógeno necrótrofo del suelo que infecta diversos cultivos y pertenece al filo Basidiomycota. Además, *R. solani* presenta algunas características particulares como crecimiento de sus hifas en ángulos rectos, ausencia de conidios (esporas asexuales) y capacidad de formar esclerocios para resistir condiciones adversas en el suelo (Ajayi y Bradley, 2018). La cepa o grupo de anastomosis AG3 es la más asociada a papas y causa dos enfermedades principales: costra negra y cancro del tallo. La primera afecta al tubérculo generando manchas marrones oscuras en la superficie (esclerocios) y deformaciones, lo que reduce la calidad, atractivo y valor comercial del producto. Por otra parte, el cancro del tallo afecta a la plántulas, donde el hongo causa lesiones en los tallos jóvenes que impiden el transporte de agua y nutrientes, lo que termina reduciendo su crecimiento y la productividad del cultivo hasta un 30% (The Royal Horticultural Society, 2021; Van den Brink y Wutsman, 2014). Para que inicie la infección, el hongo puede encontrarse inactivo en el suelo o en tubérculos con lesiones, luego se activa con el aumento de la temperatura y puede infectar, mediante trozos de micelio o esclerocios, a una nueva planta que brote del tubérculo o a plantas y tubérculos cercanos (Van den Brink y Wutsman, 2014; Wharton y Wood, 2013).

Gracias a los esclerocios que almacenan alimento, es muy difícil eliminar *R. solani* del suelo contaminado y las estrategias de control son muy limitadas. El manejo convencional se basa principalmente en control cultural apoyado de compuestos químicos. Esto incluye el uso de tubérculos certificados libres de esclerocios, prácticas de aporcado y rotación de cultivos (si no se tiene cepas AG que infecten varios cultivos). Al igual que el uso de fungicidas al suelo como el flutolanil, fludioxonil y la azoxistrobina. No obstante, estos métodos suponen un control limitado, pueden llegar a afectar a las plantas, resultan ser muy costosos y contribuyen al deterioro ambiental. Por lo que alternativas basadas en el control

biológico resultan de interés en esta área (Van den Brink y Wutsman, 2014; Wharton y Wood, 2013).

El microbioma del tubérculo de la papa ha sido propuesto como una potencial fuente de controladores biológicos. El microbioma vegetal se refiere al conjunto de comunidades bacterianas y fúngicas que han colonizado tejidos y han establecido relaciones simbióticas con las plantas. Para facilitar el estudio de estas comunidades, se ha clasificado el microbioma en compartimentos (fracciones) según el nicho que ocupan los microorganismos. La rizosfera se refiere a las comunidades microbianas del suelo que están en contacto con los exudados de las raíces de las plantas, la ectosfera consiste en las superficies vegetales colonizadas por hongos y bacterias, mientras que la endosfera se refiere a las comunidades dentro de los tejidos vegetales como las raíces, hojas o tubérculos. Es así que la microbiota cumple roles importantes en la promoción del crecimiento de las plantas, mediante microorganismos promotores de crecimiento, y en la defensa por medio de estímulos del sistema inmune vegetal o por antagonismo directo contra patógenos (Andreote et al., 2017; Compant et al., 2019; Santos y Olivares, 2021).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial del microbioma del tubérculo de papa nativa (*S. phureja*) contra *R. solani*. Para esto se realizó una revisión sistemática de literatura para establecer el conocimiento actual del microbioma de papas sanas y determinar si éste tiene el potencial de controlar enfermedades. También se estudió la diversidad microbiana de tubérculos nativos cultivados en suelo nativo del centro de origen de la papa. Por último, se buscó entender cómo la diversidad microbiana del suelo influye en la diversidad del tubérculo y en su posible potencial para controlar la costra negra.

MÉTODOS

Revisión sistemática de literatura

Se realizó una revisión de literatura para levantar la información base sobre el microbioma de la papa y su potencial de controlar enfermedades. Para esto se plantearon 2 preguntas: ¿Cuál es el microbioma de plantas de papa sana? y ¿Cómo este microbioma se puede usar para controlar enfermedades? Se usó los motores de búsqueda Web of Science y Google Scholar, mientras que los términos fueron: Potato AND (“Microbiome” OR “Microbiota”) NOT (midgut OR gut). Así, los papers obtenidos pasaron por un primer filtro de selección en base a lectura de títulos y abstracts, y por un segundo filtro basado en la lectura completa (Mengist, et al., 2020; Tawfik, et al., 2019).

Cultivo de papas, colección de muestras, desinfección y almacenamiento

En abril de 2019 en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP se cultivaron las variedades nativas de *S. phureja* (chaucha amarilla y chaucha ratona) *in vitro*, que a los 15 días fueron aclimatizadas. A la par se recolectaron muestras de suelo nativo sin cultivar y la mitad de éstas se sometieron a un tratamiento térmico (121°C por 1 hora). Esta investigación fue autorizada por el Ministerio del Ambiente del Ecuador bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos Código: MAE–DNB–CM–2018–0085, de fecha 9 de julio del 2018, bajo la denominación: “ESTUDIO DE DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA MÉDICA, VETERINARIA, INDUSTRIAL, AMBIENTAL Y AGROPECUARIA DEL ECUADOR”. El experimento consistió en cultivar 20 plantas de cada variedad en macetas bajo 2 tratamientos: 10 en suelo nativo (N) y 10 en el suelo bajo tratamiento térmico (T). Después de 4 meses se cosechó los tubérculos de cada tratamiento junto con una muestra de suelo a 5 cm. En el laboratorio se guardaron las muestras de suelo en tubos a -80°C y las papas a 8°C. Para la desinfección, se escogieron 2 tubérculos por

planta y se trabajó en una cámara de flujo laminar siguiendo el protocolo de Morais, et al. (2018) (detalle en **Anexo 1**). Por último, se cortaron los tubérculos, se colocaron en tubos falcon de 50mL, se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron (Tidke, et al., 2017).

Concentración y aislamiento de endófitos

Para concentrar los endófitos y aislarlos se siguió el protocolo de Jiao et al. (2006), con algunas modificaciones. Primero se machucaron las papas liofilizadas y el polvo resultante (5 g por muestra) se colocó en tubos falcon junto con 25 mL de buffer enzimático (preparación en **Anexo 1**). Los tubos se incubaron en un shaker a 28°C y 125 rpm por 12 horas. Después de esto se realizaron centrifugaciones diferenciales con el objetivo de separar los componentes celulares vegetales de las bacterias y hongos (detalle en **Anexo 1**). Posterior, 1 mL del sobrenadante restante se empleó como la solución 10^{-1} para preparar diluciones seriadas hasta 10^{-7} , colocando 100 μ L de la suspensión microbiana en 900 μ L de dH_2O estéril. Así se cultivaron, por extensión en placa, 100 μ L de las diluciones en 4 medios por duplicado: King's B, R2A, TSA y Agar Humato de Potasio (HV). Se esperó 3-10 días para observar las colonias, las de morfología única se pasaron a TSA y se incubaron por 4 días a T° ambiente (**Anexo 2**). Luego los cultivos puros se pasaron al medio TSB y finalmente se almacenaron en glicerol 80% a -80°C (preparación de medios **Anexo 1**) (Sanders, 2012).

Extracción de ADN y secuenciamiento

Tomando otro 1 mL del sobrenadante obtenido por muestra, se usó una centrifuga fría a 13500 rpm por 5 minutos para obtener un pellet que se guardó a -20°C. Luego se utilizó el kit DNeasy Power Soil Pro® (Qiagen, Hilden, Alemania) para la extracción de ADN de las muestras de papa y de suelo, y el equipo Qiubit 4 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) para medir su concentración. Para el ADN bacteriano se amplificó la región V3-V4 del gen 16S ARNr usando los primers 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') y

806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Mientras que para hongos se amplificó la región ITS2 utilizando los primers ITS1-F (5-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3). Los protocolos de amplificación se realizaron de acuerdo a Finkel, et al. (2019) (detalle en **Anexo 1**). Por último, se empleó el kit 600-cycle V3 en la plataforma Illumina MiSeq 2x300 (Illumina, San Diego, CA) (Finkel, et al., 2019).

Procesamiento y análisis de datos

Los datos del secuenciamiento de bacterias y hongos se procesaron con MT-Toolbox y los reads arrojados por esta herramienta se filtraron con Sickle; eliminando reads con Qscores menores a 20, al igual que muestras con menos de 1000 reads (Joshi y Sickle, 2011; Yourstone, et al., 2014). Después se utilizó el paquete DADA2 de R para colapsar las secuencias restantes. La asignación taxonómica de ASVs de bacterias se completó con el método naive Bayes khmer en DADA2, con la base de datos Silva 132. Mientras que para los ASVs de hongos se usó el método naive Bayes khmer con el paquete MOTHUR, según la base de datos UNITE (Callahan et al., 2016; Schloss et al., 2009). Así se obtuvieron tablas de conteos que se trabajaron en R con los paquetes Ohchibi y Vegan para analizar la diversidad α y β , así como las composiciones de las comunidades (Oksanen, et al., 2016; Salas, 2019).

Bioensayos de screening de inhibición contra *Rhizoctonia solani*

Se cultivaron los aislados bacterianos en TSA por 7 días y a *R. solani* en PDA por 10 días en oscuridad (preparación en **Anexo 1**). Luego con un sacabocados (0.7 cm) se tomó un trozo central del agar con el hongo y se colocó en el centro de cajas con PDA. Después, se cultivaron 4 aislados bacterianos por cada caja PDA (por triplicado) a 1 cm del extremo. Se incubaron en oscuridad 7 días y luego se midieron las distancias de inhibición con ImageJ 1.52a. Se usó como control positivo a *Streptomyces lydicus*, mientras se probaron 106 aislados: 54 de papas de suelo N y 52 de papas de suelo T (Pérez, et al., 2015).

RESULTADOS

Revisión sistemática de literatura

Inicialmente se encontraron 59 artículos con Web of Science y se añadieron 10 papers de revisiones encontrados con Google Scholar. Tras el primer filtro de selección se descartaron 10 artículos y después del segundo se seleccionaron 38 papers. De éstos, 20 se destinaron para responder la primera pregunta de la revisión y 18 se usaron para responder la segunda pregunta (**Figura 1**).

Microbioma de plantas de papa sanas y su uso para controlar enfermedades

Se encontró que 17 de los 20 estudios escogidos se realizaron en Norteamérica y Europa. Mientras que un solo estudio se realizó en Sudamérica. Éste consistió en una colaboración, donde el experimento se llevó a cabo en Holanda y las muestras provinieron de Perú. También se ve que la mayoría de estudios se enfocan en el microbioma de la rizosfera/rizoplasma/endosfera de raíces (14 papers) y de suelo (3). Mientras que, sobre el microbioma de tubérculo solo se reportan 2 papers (**Figura 2A**). Por otra parte, se observa que 14 de 20 papers emplean variedades mejoradas y solo 6 usan variedades nativas. Además, que los estudios exploran la diversidad bacteriana o de bacterias y hongos, mientras que solo uno se enfocó exclusivamente en hongos (**Figura 2B**). Con respecto a la rizosfera de plantas sanas de variedades mejoradas se encontró que está dominada por los filos bacterianos Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes, con menor abundancia de Acidobacteria y Firmicutes. También está dominada por los hongos Ascomycota y Basidiomycota, con menor abundancia de Glomeromycota. Lo mismo se encontró para rizosfera de papas nativas, incluyendo al grupo Zygomycota como dominante. Cabe recalcar que en tubérculos nativos se reporta mayor abundancia de bacterias del filo Firmicutes y menor de Bacteroidetes. De manera que la investigación en el microbioma de papas se realiza

mayormente en países del hemisferio norte, con un enfoque en el suelo y la rizosfera de variedades mejoradas. A la vez que el microbioma de tubérculos, particularmente nativos, casi no se ha estudiado y menos aún en su centro de origen.

En la **Tabla 1** se presentan 12 de los 18 papers seleccionados para esta sección, debido a que los 6 excluidos repiten los hallazgos o no indican un agente de control particular. Aquí se muestran las estrategias del microbioma para controlar enfermedades, que incluyen: el uso de suelos supresivos, inoculación de endófitos antagónicos y no antagónicos que atacan patógenos o activan la defensa vegetal, la producción de metabolitos secundarios y enmiendas orgánicas para alterar el microbioma y favorecer la selección de microorganismos benéficos. Además, se encontró que para el control de *R. solani* se pueden aprovechar los géneros *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Methylobacterium*, *Clavibacter* y *Frigoribacterium*, y el género fúngico *Trichoderma*.

Microbioma de papas nativas cultivadas en suelo andino

Las comunidades bacterianas del suelo son más diversas que las del tubérculo (**Figura 3A y 3B**). A la vez que las comunidades bacterianas del suelo y tubérculo están separadas ($R^2=0.36$, $p=0.001$) (**Figura 3C**). Por otra parte, se presenta una clara separación entre las comunidades bacterianas de tubérculos de chaucha amarilla y las de chaucha ratona ($R^2=0.29$, $p=0.033$) (**Figura 3D**). Además, se observa que estas comunidades en suelo y tubérculo están dominadas por Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria, con mayor abundancia de Firmicutes y menor de Bacteroidetes en el tubérculo (**Figura 3E**). Adicionalmente, se encontró que las comunidades fúngicas del suelo son más diversas que las del tubérculo (**Figura 3F y 3G**). Y se indica una clara separación entre estas dos comunidades ($R^2=0.52$, $p=0.001$) (**Figura 3H**). Al contrario, no se muestra una separación entre comunidades fúngicas del tubérculo de ambas variedades ($R^2=0.1$, $p=0,53$) (**Figura 3I**).

Finalmente, se ve que ambas comunidades fúngicas están dominadas por Ascomycota y Basidiomycota, con mayor abundancia de los órdenes Archaeorhizomycetales y Saccharomycetales, y menor de Mortierellales en tubérculo (**Figura 3J**). Todo esto demuestra que las comunidades microbianas son menos diversas en el tubérculo que en el suelo y que solo las comunidades bacterianas muestran diferencias entre variedades.

Alteración del microbioma del suelo nativo por tratamiento térmico

Las comunidades bacterianas de suelo nativo (N) son más diversas que las del suelo nativo bajo tratamiento térmico (T) (**Figura 4A y 4B**). Al igual que ambas comunidades se encuentran claramente separadas ($R^2=0.51$, $p=0.001$) (**Figura 4C**). Además, se muestra que la abundancia de los filos Acidobacteria y Actinobacteria se reduce bajo el tratamiento térmico y Bacteroidetes se encuentra aumentado (**Figura 4D**). Por otra parte, las comunidades fúngicas del suelo N son más diversas que las de suelo T (**Figura 4E y 4F**). También, existe una clara separación entre las comunidades de ambos suelos ($R^2=0.38$, $p=0.001$) (**Figura 4G**). Y los órdenes Agaricales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales y Sordariales se encuentran aumentados bajo tratamiento térmico (**Figura 4H**). Por lo que el tratamiento térmico altera las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo.

Alteraciones del microbioma de tubérculos de plantas cultivadas en suelo nativo sometido a tratamiento térmico

Las comunidades bacterianas de tubérculos de plantas de suelo nativo (N) son más diversas que las comunidades bacterianas de tubérculos de plantas de suelo nativo bajo tratamiento térmico (T) (**Figura 5A y 5B**). Además, las dos comunidades se encuentran claramente separadas, donde las de papas de suelo T son más uniformes ($R^2=0.51$, $p=0.001$) (**Figura 5C**). Adicionalmente, se observa una clara alteración en la composición de la comunidad bacteriana en los tubérculos de plantas de suelo T, donde la temperatura genera

una reducción de la abundancia de la mayoría de filos y el grupo Proteobacteria termina dominando casi por completo la comunidad (**Figura 5D**). De forma que se evidencia que el tratamiento térmico altera las comunidades bacterianas del tubérculo porque el suelo se encuentra alterado. En cambio, no se muestran diferencias en la diversidad de las comunidades fúngicas de tubérculos de suelo N y de suelo T (**Figura 5E y 5F**). Tampoco existe una clara separación entre las comunidades fúngicas de tubérculos de suelo N y suelo T ($R^2=0.07$, $p=0.32$) (**Figura 5G**). Por último, ambas comunidades tienen composiciones fúngicas muy similares (**Figura 5H**). Por ende, el tratamiento térmico no altera significativamente las comunidades fúngicas del tubérculo, aunque sí llega a alterar las comunidades del suelo.

Potencial inhibitorio *in vitro* de endófitos bacterianos de tubérculos de plantas de suelo nativo y de tubérculos de plantas de suelo bajo tratamiento térmico

La **Figura 6A** muestra un endófito bacteriano de tubérculo que tiene una actividad inhibitoria contra *R. solani* similar a la del control *S. lydicus*, de forma que todos los aislados con una actividad de este tipo se consideraron bacterias candidatas que tienen el potencial de controlar a este patógeno. A partir de esto, la gráfica indica que 18 de los 106 aislados probados son candidatos para el control de *R. solani*, donde 12 provienen de tubérculos de suelo N y 6 de tubérculos de suelo T. Además, indica que 10 aislados bacterianos tienen un potencial inhibitorio igual o mayor al del control *S. lydicus* (**Figura 6B**). De forma que ciertos endófitos del microbioma del tubérculo tienen el potencial de controlar a *R. solani*. Adicionalmente, se encontró que el 78% de endófitos de tubérculo de suelo N no tienen potencial inhibitorio mientras que el 88% de endófitos de papas de suelo T tampoco lo tienen. Al igual que, casi el doble de endófitos de papas de suelo N tienen este potencial inhibitorio (22%) en comparación con aquellos de tubérculos de suelo T (solo 12%) (**Figura 6C**). Cabe mencionar que estas diferencias resultan apenas significativas (“barely significant”).

DISCUSIÓN

Importancia de los estudios de microbiomas vegetales nativos en sus centros de origen

Según los resultados de la **Figura 2**, éste es uno de los pocos estudios que han explorado el microbioma endófito de tubérculos de papas nativas y es el primer estudio realizado en los Andes. Es importante estudiar esta diversidad microbiana y vegetal en los centros de origen de cultivos agrícolas por lo siguiente. Se puede aprovechar la gran biodiversidad de zonas del Ecuador, para varias aplicaciones como programas de mejoramiento genético para obtener nuevas variedades más productivas o resistentes a estrés biótico y abiótico. No obstante, con respecto al microbioma se puede utilizar el conocimiento del impacto de la domesticación y mejoramiento sobre microbiomas nativos (Benlioglu y Adak, 2019; Hummer y Hancock, 2015). Estudios como el de Philippot et al. (2013) presentan el concepto de “going back to the roots”, que indica que durante la domesticación y mejoramiento se seleccionaron características de interés en cultivos, pero se dejó de lado al microbioma y sus roles importantes en crecimiento y protección vegetal. De forma que en variedades nativas se han detectado múltiples resistencias y funciones biológicas favorables relacionadas con las interacciones que tienen con su microbioma. Por lo que se puede estudiar estos sistemas nativos para generar aplicaciones benéficas en sistemas agrícolas (Pérez, et al., 2018). Adicionalmente, este conocimiento ha brindado nuevas propuestas de estudio en donde se intenta incorporar el microbioma en programas de cruzamientos para mejorar sistemas agrícolas (Gopal y Gupta, 2016; Trivedi, et al., 2017).

El microbioma del suelo es más diverso y da origen al microbioma del tubérculo

De acuerdo a los resultados (**Figura 3**) las comunidades microbianas del tubérculo son menos diversas que las del suelo. Éste es un resultado esperado debido a que se conoce que el suelo es uno de los ecosistemas microbianos más diversos. Éste cuenta con una gran

cantidad de biomasa y con una impresionante diversidad implicada en varias funciones ecosistémicas importantes como: el reciclaje de bioelementos como el N, C y P, fijación de N y promoción del crecimiento, protección frente a patógenos y estimulación del sistema inmune vegetal (Dubey, et al., 2019). Al mismo tiempo, se observa que muchos de los grupos bacterianos y fúngicos dominantes se comparten en suelo y tubérculo, con unas pocas diferencias. Esto se explica porque una parte del microbioma bacteriano del suelo es reclutado por la planta para formar parte del microbioma endófito del tubérculo. Esto fue determinado para las comunidades bacterianas del tubérculo en el estudio de Buchholz, et al. (2019). Donde se encontró que una parte de este microbioma comparte muchas similitudes con el suelo, donde el genotipo de la planta presentó menor influencia. Adicionalmente, ellos proponen que una posible ruta de colonización del tubérculo es mediante el ingreso por raíces y luego estolones de la planta madre. Por otra parte, también reportan que diferencias entre las comunidades de suelo y tubérculo se deben a que una parte de la papa contiene endófitos pasados verticalmente desde la planta madre. Sin embargo, en nuestro caso esto no ocurre porque al emplear plantas cultivadas *in vitro*, se reduce la cantidad y diversidad de endófitos que podrían provenir de la planta madre. Por ende, las diferencias se deben al reclutamiento y para los hongos puede que ocurra lo mismo, pero no se ha reportado en la literatura.

El suelo T como modelo de suelos agrícolas y su impacto en la diversidad microbiana

En primera instancia, se observa que el tratamiento térmico reduce la diversidad microbiana del suelo nativo y ciertos taxones fúngicos se ven aumentados (**Figura 4**). Esto se esperaba debido a que estos taxones posiblemente producen esporas resistentes a la temperatura, mientras que altas temperaturas y presiones se han empleado para reducir la diversidad en suelo y estudiar sus funciones (Carter, et al., 2007). En este caso, se realizó este tratamiento para simular las condiciones de suelos menos diversos como muchos de los

suelos empleados en agricultura, en donde estas prácticas pueden reducir la diversidad de las comunidades microbianas. Por ejemplo, prácticas como el arado o labranza alteran físicamente las comunidades y pueden llegar a reducirlas, al cambiar las condiciones de los microambientes donde habitan los microorganismos. También, el uso de fertilizantes puede reducir servicios ecosistémicos como la fijación de N o actividades relacionadas con el P en micorrizas. Finalmente, la aplicación de agroquímicos para el control de plagas, malezas y patógenos puede afectar a la microbiota benéfica del suelo, donde se ha reportado incluso incremento en niveles de *Rhizoctonia* spp. tras el uso de herbicidas (Devi, et al., 2018; Gupta, et al., 1997). Además, acerca de la composición en suelos agrícolas, los pocos estudios realizados muestran que a nivel de filo no se detectan muchas diferencias entre estos suelos y aquellos nativos, pero que a niveles taxonómicos menores puede darse la pérdida de grupos menos abundantes que pueden tener funciones importantes, lo que coincide con los resultados obtenidos (Schmidt y Waldron, 2015).

La reducción de la diversidad bacteriana de suelo y tubérculo afecta el potencial de defensa de las plantas frente a *R. solani*

La clara reducción de diversidad y alteración de comunidades bacterianas de tubérculos provenientes de suelos T (**Figura 5**) se explica por el impacto que tiene la diversidad del suelo sobre la endosfera del tubérculo. Similarmente, el estudio de Van der Voort, et al. (2016) evaluó el impacto de calentar el suelo, a diferentes temperaturas, sobre la rizosfera de plantas de remolacha. Aquí se encontró un aumento en la abundancia de Proteobacteria, específicamente de los taxones Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Esto coincide con los resultados obtenidos, donde la comunidad es dominada casi por completo por Gammaproteobacteria (abundancias a nivel de clase) y Actinobacteria y Bacteroidetes se reducen drásticamente. Al enfocarnos a nivel de género, se ve que el grupo dominante consiste en géneros no clasificados de la familia Enterobacteriaceae, con aumento

también de *Acinetobacter* spp. Mientras que *Pantoea* spp. se ve un poco reducido y la abundancia de los géneros *Pseudomonas* y algunos de la familia Rizobiales se reduce bastante. Esto resulta importante porque *Flavobacterium* spp. y *Chitinophaga* spp. (Bacteroidetes) se han visto implicados en el efecto supresivo de suelos de remolacha, arroz y maíz contra *R. solani* (Carrión, et al., 2019). También que según la revisión anterior (**Tabla 1**) *Flavobacterium* spp. (Actinobacteria), *Methylobacterium* spp. (Alphaproteobacteria) y *Pseudomonas* spp., tienen la capacidad de controlar *R. solani* y aquí se están perdiendo en el tubérculo por el tratamiento térmico. En hongos parece ser que el reclutamiento endófito no se ve afectado por el suelo T, pero se requieren más estudios.

Potencial inhibitorio de microbiomas más diversos: Consideraciones y limitaciones

En conjunto, los resultados (**Figuras 5 y 6**) indican que microbiomas más diversos resultan en un mayor potencial inhibitorio contra la costra negra. No obstante, esto no siempre ocurre porque hay que considerar que puede existir redundancia funcional (Nannipieri, et al., 2017). Sin embargo, aquí muchos de los grupos que se pierden con la temperatura corresponden a grupos poco abundantes, donde una mayor diversidad sí podría aumentar la probabilidad de reclutarlos. Algo similar se observó en tomate, donde la composición bacteriana del suelo determinaba la capacidad de respuesta de estas plantas frente a *R. solani* y los taxones importantes correspondían a grupos raros (Wei, et al., 2019). Adicionalmente, como este resultado fue apenas significativo, se podría alcanzar la significancia estadística al aumentar el número de muestras analizadas. Al igual que se puede identificar estas bacterias y confirmar la actividad inhibitoria de estos endófitos con más ensayos *in vitro*, ensayos de interacción y también pruebas *in vivo* para confirmar que funcionan fuera de las condiciones de laboratorio.

CONCLUSIONES

En la revisión sistemática de literatura se encontró 18 artículos que indican que el estudio del microbioma de plantas de papa se ha enfocado en la rizosfera. A la vez que existen solo 6 estudios sobre el microbioma de papas nativas y solo 2 enfocados en los tubérculos. Además, no se ha realizado ninguna investigación sobre el microbioma en el centro de origen de la papa: los Andes. También, que el microbioma de papa tiene el potencial de controlar enfermedades a través de diversos mecanismos.

Según el estudio de diversidad, las comunidades microbianas en el tubérculo son menos diversas que en el suelo. Donde el microbioma de suelo y tubérculo en general se encuentra dominado por Ascomycota, Basidiomycota, Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria, con mayor abundancia de Firmicutes y menor de Bacteroidetes en tubérculos; lo que coincide con lo reportado en la literatura para plantas de papa nativas. A la vez que el microbioma del suelo funciona como el origen, en parte, del microbioma endófito del tubérculo.

Y según los experimentos, la reducción de diversidad en el suelo generó un ensamblaje anormal del microbioma del tubérculo, que incluyó menor cantidad de endófitos bacterianos con el potencial de controlar la enfermedad provocada por el hongo patógeno *R. solani*.

TABLAS

Tabla 1. Resumen de la literatura sobre el uso del microbioma de papa para controlar enfermedades

#	Origen	Patógenos	Estrategia de control	Agentes de control	Mecanismos de control
1	Suelo con larga historia de cultivo de papas	<i>Phytophthora infestans</i>	Suelos supresivos	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Paenibacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp.	Degradación de esporangios, inhibición de crecimiento
2	Suelo con larga historia de cultivo de papas	<i>S. scabies</i>	Suelos supresivos	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptomyces</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Lysobacter</i> spp.	Posible producción de antibióticos, competencia
3	Suelo con larga historia de cultivo de papas	<i>S. scabies</i>	Suelos supresivos	<i>Lysobacter</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Bacillus</i> sp.	Posible producción de antibióticos, competencia
4	Mezcla suelos con cultivo de papas + peridermo de tubérculo (ectosfera) <i>S. tuberosum</i> Russet Norkotah/Burbank	<i>Phytophthora erythroseptica</i>	Suelos supresivos	<i>Bacillus simplex</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pseudomonas koreensis</i> , <i>Pseudomonas lini</i>	Reducción de formación de zoosporas, inhibición de crecimiento. Tal vez biosurfactantes, micorrizas
5	<i>S. tuberosum</i> (rizosfera)	<i>R. solani</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Fusarium graminearum</i>	Suelos supresivos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Producción de HCN, β -1,3-glucanasa, quitinasa y proteasas
6	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Cilena (endosfera)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Inoculación de antagonicos	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viridae</i>	Hiperparasitismo
7	<i>S. tuberosum</i> L. "Bionta" (endosfera)	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>R. solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , and <i>Phytophthora cactorum</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>S. scabies</i> , <i>X. campestris</i>	Inoculación de endófitos antagonicos	<i>Methylobacterium</i> sp., <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Frigoribacterium</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Pantoea</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp.	Producción de antibióticos/ antifúngicos, glucanasas, quitinasas, proteasas, pectinasas
8	<i>S. tuberosum</i> (endosfera)	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	Inoculación de endófitos no antagonicos	<i>Methylobacterium</i> sp.	Activación ISR, mecanismos antioxidantes
9	<i>S. tuberosum</i> cv. Zagadka & Nigrú in vitro (endosfera)	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Inoculación de endófitos antagonicos y no antagonicos	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp.	Pectinasas, celulasas, proteasas. Colonización activa. Activación del sistema antioxidaante
10	<i>S. tuberosum</i> (rizosfera, ectosfera, endosfera)	<i>P. infestans</i>	Metabolitos secundarios	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. frederiksbergensis</i> , <i>P. veronii</i> , <i>P. moraviensis</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. jessenii</i>	Inhibición de crecimiento, formación y germinación de esporangios. Y en la motilidad de zoosporas (antifúngicos). Producción de HCN
11	<i>S. tuberosum</i> cv. Yungay (rizosfera)	*	Metabolitos secundarios	Firmicutes y Actinobacteria: <i>Bacillus</i> spp., <i>Paenibacillus</i> spp., <i>Rhodoplanes</i> spp., <i>Sphingobium</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp.	Compuestos antimicrobianos, sideróforos, toxinas
12	Para inoculación: <i>Solanum tuberosum</i> cv. Nishiyutaka (rizosfera)	<i>S. scabies</i> , <i>S. turbigidiscabies</i> , <i>S. acidiscabies</i>	Enmienda de salvado de arroz altera rizofera. Luego inoculación con antagonistas	<i>S. rishiriensis</i> , <i>S. roseochromogenus</i>	Diferencias en β -div. Se reduce α -div. Aumentan Actinomycetales y Saprospirales (G+), se reduce Acidobacteria

En azul se indican los estudios relacionados con el patógeno *Rhizoctonia solani* y en negritas los géneros que pueden controlarlo. El asterisco (*) indica que no se estudió un patógeno particular en este artículo.

FIGURAS

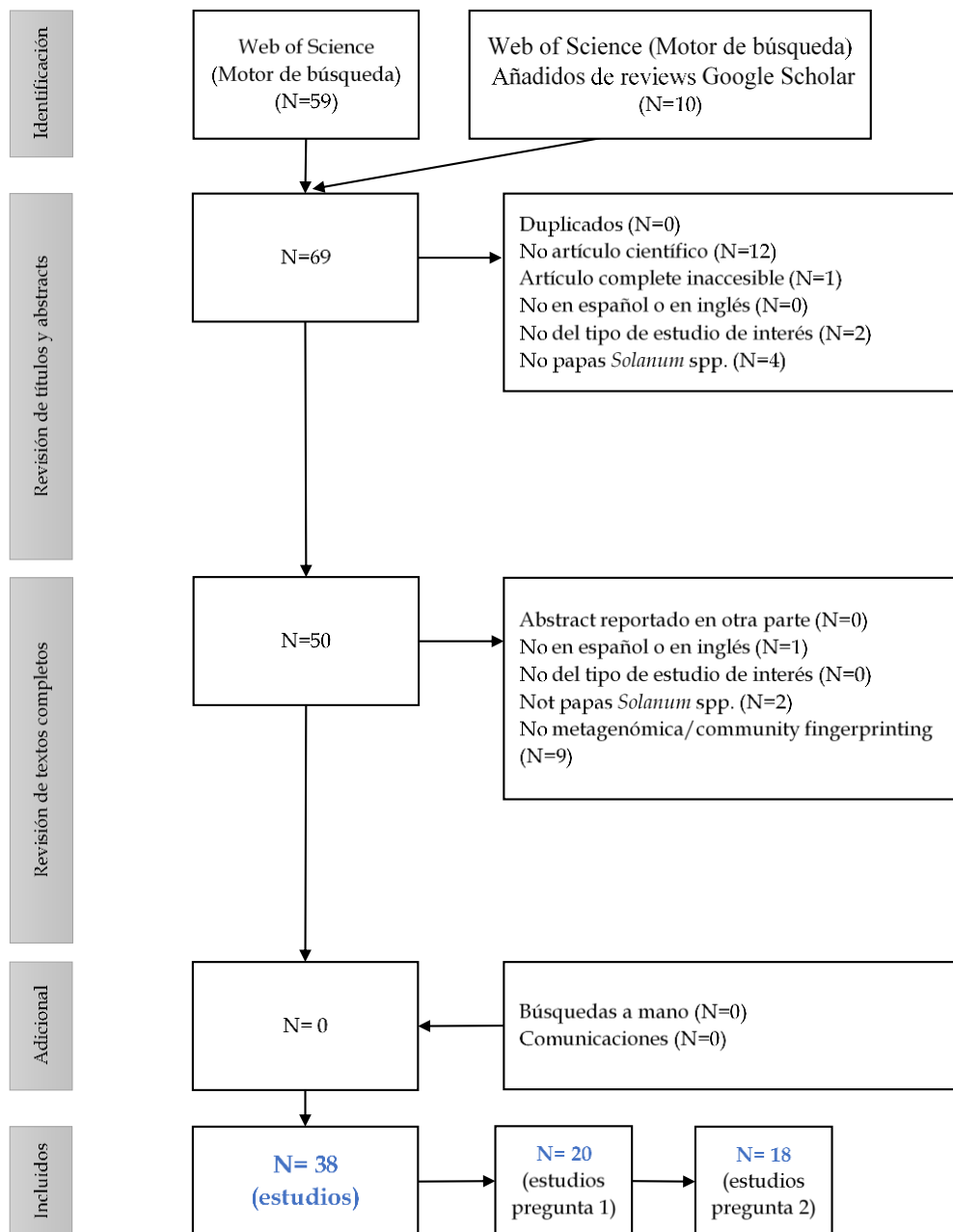


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA del proceso sistemático de revisión de literatura

Con los motores de búsqueda se obtuvieron 69 artículos que pasaron por dos filtros de selección, en base a los criterios de exclusión mostrados. Al final se obtuvo un total de 38 papers, 20 para responder la primera pregunta de la revisión y 18 para responder la segunda.

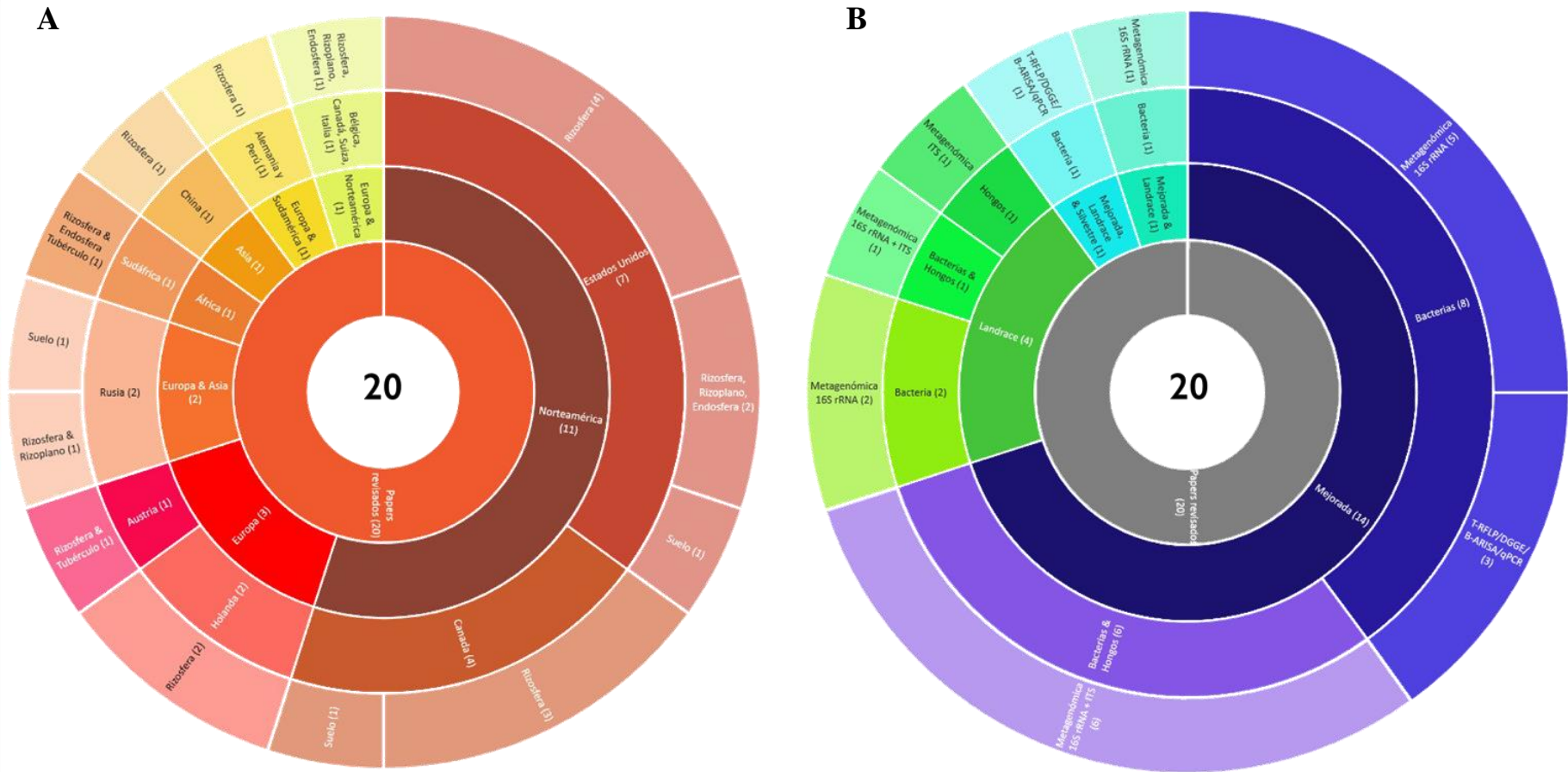


Figura 2. Resumen de las características de los 20 estudios relacionados con el microbioma de plantas de papa sanas

A) Clasificación de los 20 artículos según el continente y país donde se llevaron a cabo los estudios, al igual que se clasifican de acuerdo al compartimento del microbioma de papas que analizaron. **B)** Clasificación de los 20 artículos según la variedad de papa, los microorganismos que estudian y el tipo de análisis del microbioma que realizan.

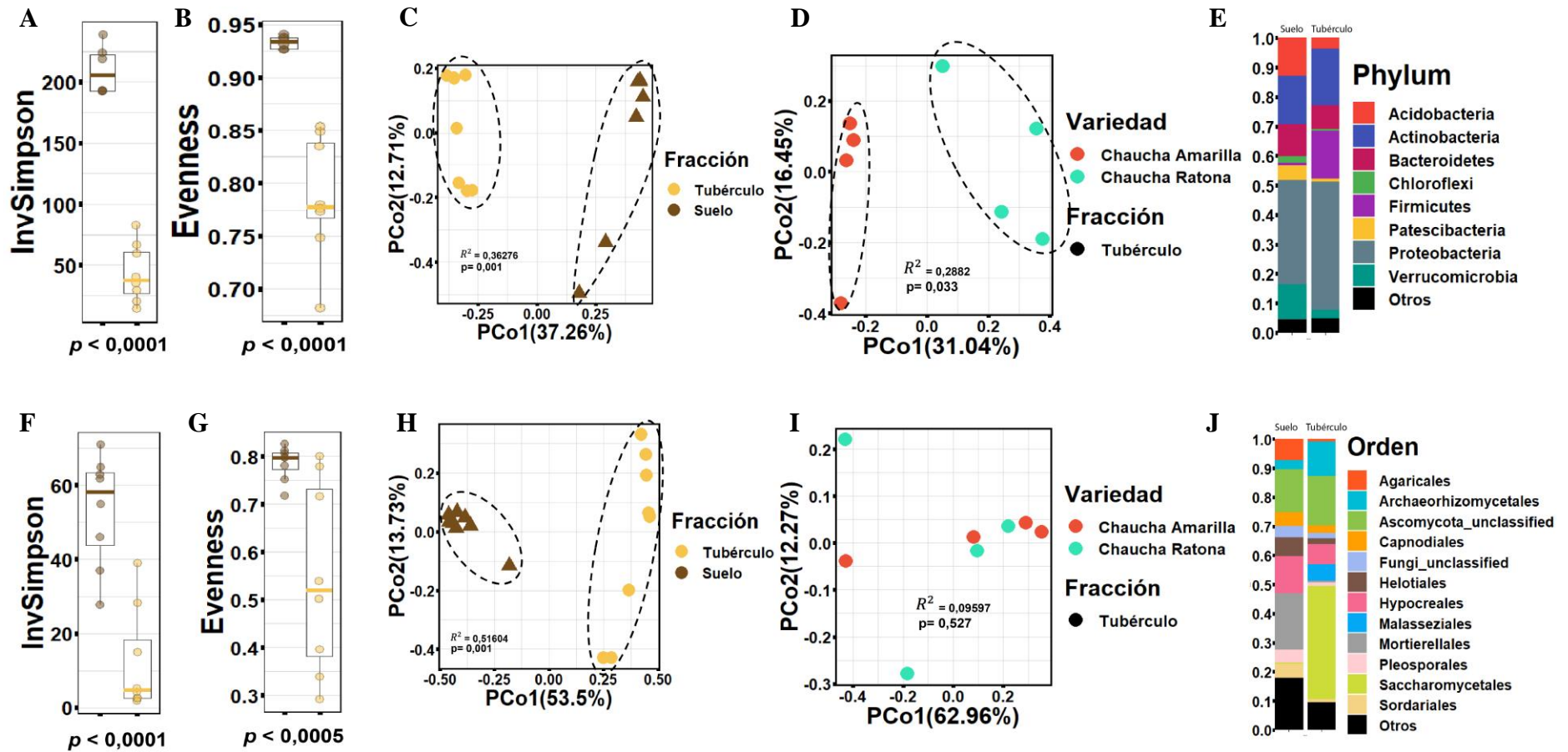


Figura 3. Diversidad α , diversidad β y composición de las comunidades bacterianas y fúngicas de plantas de papa cultivadas en suelo nativo

A) Índice de riqueza del Inverso de Simpson y **B)** Uniformidad o evenness de las comunidades bacterianas del suelo y del tubérculo nativo. **C)** Análisis de coordenadas principales (PCoA), mediante la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, de las comunidades bacterianas del tubérculo y suelo. **D)** PCoA de las comunidades bacterianas del tubérculo de ambas variedades. **E)** Abundancia relativa de los filos bacterianos más abundantes en las comunidades de suelo y tubérculo. **F)** Índice del Inverso de Simpson y **G)** Evenness de las comunidades fúngicas del suelo y del tubérculo. **H)** PCoA de las comunidades fúngicas del suelo y tubérculo. **I)** PCoA de las comunidades fúngicas del tubérculo de ambas variedades. **J)** Abundancia relativa de los órdenes fúngicos más abundantes en las comunidades provenientes de tubérculo y suelo. Para el índice del Inverso de Simpson y evenness se realizó una prueba t. Mientras que en todos los PCoA se realizó la prueba estadística PERMANOVA para determinar la varianza explicada por el modelo (R^2) y la significancia (p). *Los círculos entrecortados solo indican las agrupaciones de las muestras y no indican intervalos de confianza.

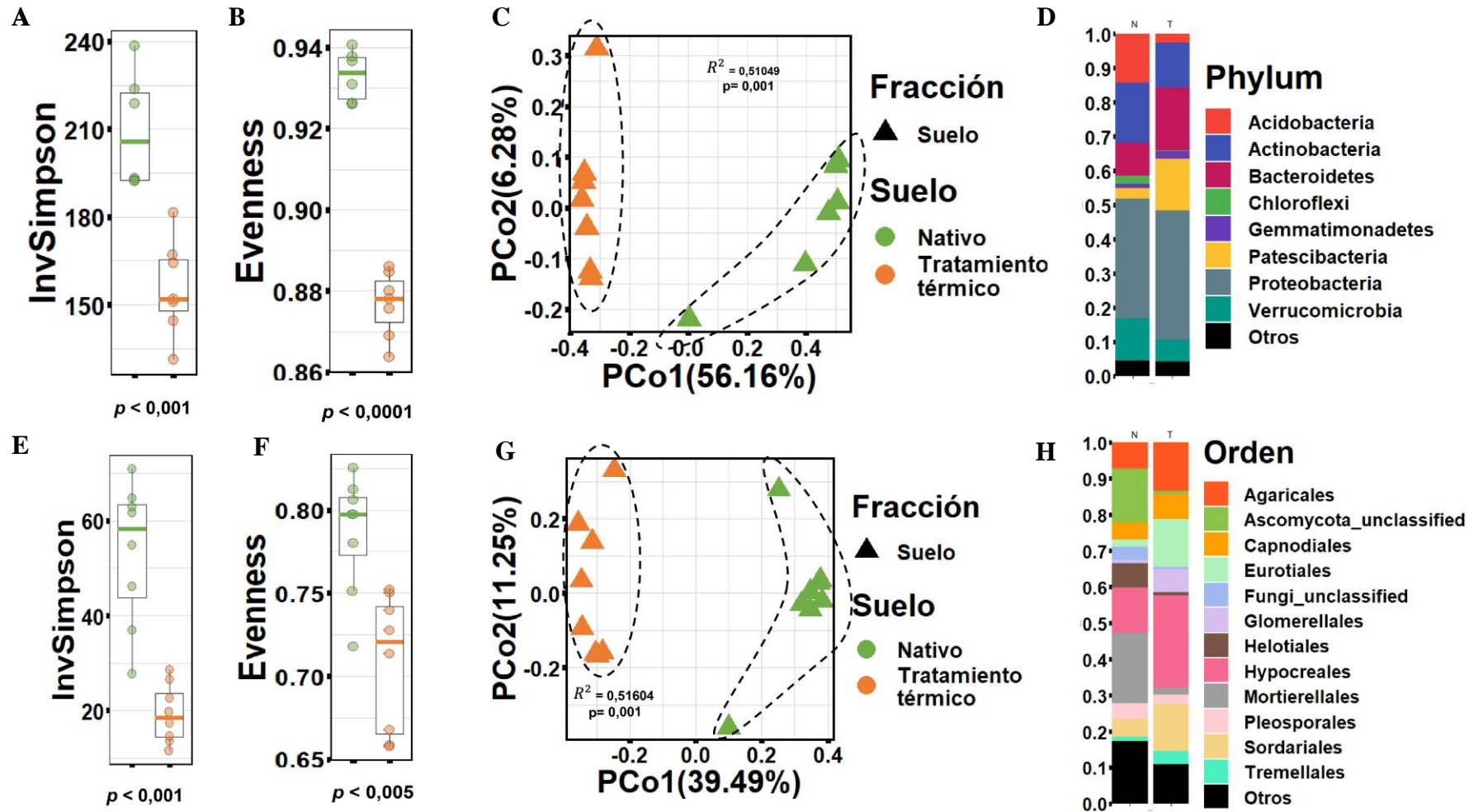


Figura 4. Diversidad α , diversidad β y composición de las comunidades bacterianas y fúngicas de suelo nativo y de suelo nativo bajo tratamiento térmico

A) Índice de riqueza del Inverso de Simpson y **B)** Evenness de las comunidades bacterianas de suelo nativo (N) y de suelo bajo tratamiento térmico (T). **C)** PCoA, mediante la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, de las comunidades bacterianas de ambos suelos. **D)** Abundancia relativa de los filos bacterianos más abundantes en las comunidades de ambos suelos. **E)** Índice del Inverso de Simpson y **F)** Evenness de las comunidades fúngicas del suelo N y del suelo T. **G)** PCoA de las comunidades fúngicas de los dos suelos. **H)** Abundancia relativa de los órdenes fúngicos más abundantes en las comunidades provenientes de ambos tipos de suelo. Se realizó una prueba t para los índices de diversidad α (Inverso de Simpson y evenness). De igual forma, se empleó la prueba estadística PERMANOVA en los análisis de diversidad β (PCoA) para determinar la varianza explicada por el modelo (R^2) y la significancia (p). *Los círculos entrecortados solo indican las agrupaciones de las muestras y no indican intervalos de confianza.

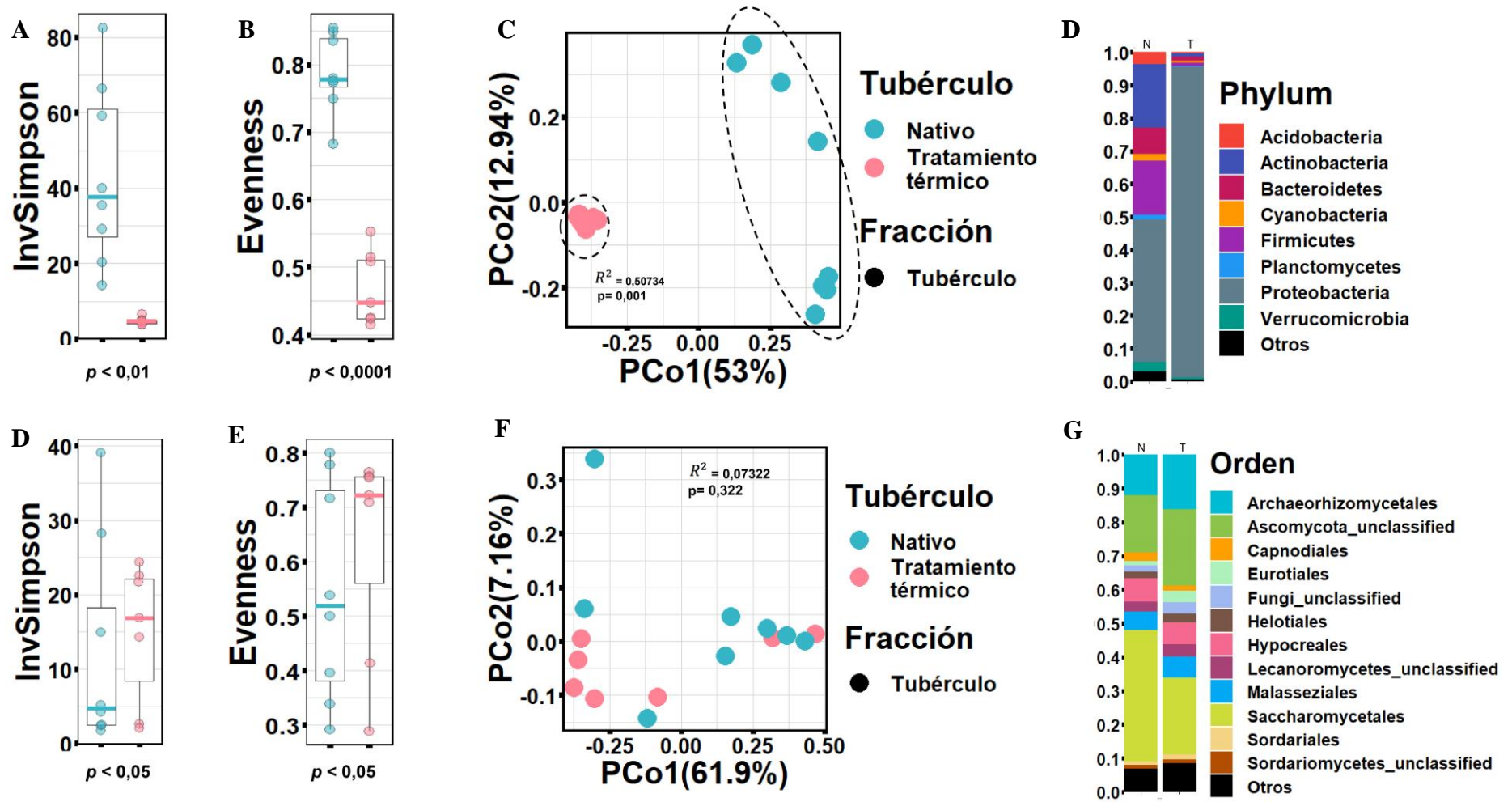
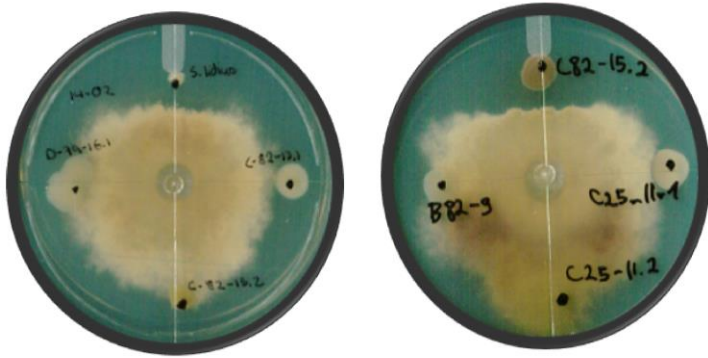


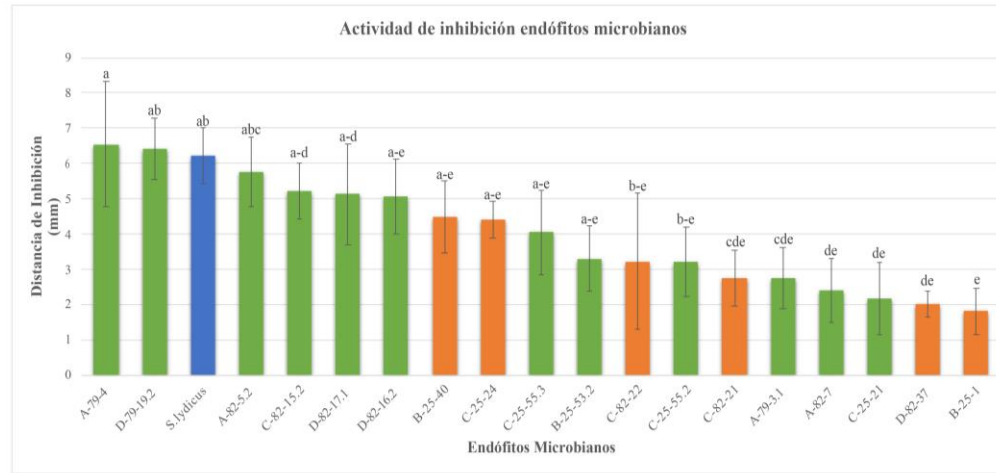
Figura 5. Diversidad α , diversidad β y composición de las comunidades bacterianas y fúngicas de tubérculos obtenidos de plantas cultivadas en suelo nativo y de tubérculos obtenidos de plantas cultivadas en suelo nativo sometido a tratamiento térmico

A) Índice del Inverso de Simpson y **B)** Evenness de las comunidades bacterianas de los tubérculos de plantas cultivadas en suelo N y las comunidades bacterianas de tubérculos de plantas cultivadas en suelo T. **C)** PCoA, construido con la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, de las comunidades bacterianas de tubérculos de suelo N y las de tubérculos de suelo T. **D)** Abundancia relativa de los filos bacterianos más abundantes en las comunidades de papas de plantas de suelo N y de papas de plantas de suelo T. **E)** Índice del Inverso de Simpson y **F)** Evenness de las comunidades fúngicas de los tubérculos provenientes de plantas de suelo N y de las comunidades fúngicas de tubérculos que vienen de plantas de suelo T. **G)** PCoA de las comunidades fúngicas de los tubérculos obtenidos de las plantas cultivadas en los dos tipos de suelos. **H)** Abundancia relativa de los órdenes fúngicos más abundantes en las comunidades provenientes de tubérculos de plantas cultivadas en ambos tipos de suelo. Se realizó una prueba t para los índices de diversidad α . A la vez que se empleó el PERMANOVA en los PCoA para encontrar la varianza explicada por el modelo (R^2) y la significancia (p). *Los círculos entrecortados solo indican las agrupaciones de las muestras y no indican intervalos de confianza.

A

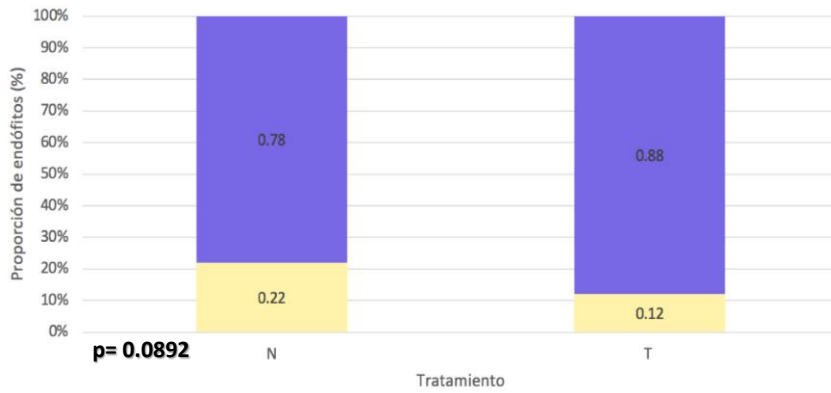


B



C

Proporción de endófitos con potencial inhibitorio de Suelo Nativo vs. Suelo T



■ Tubérculo de suelo N
 ■ Tubérculo de suelo T
 ■ Control

■ Con potencial ■ Sin potencial

Figura 6. Resultados de los bioensayos de screening *in vitro* del potencial inhibitorio de los endófitos bacterianos de tubérculos de suelo nativo y de suelo nativo bajo tratamiento térmico

A) Cajas Petri con los resultados del bioensayo después de 7 días. La caja de la izquierda muestra el efecto inhibitorio del control utilizado (*Streptomyces lydicus*) en forma de un halo de inhibición en la parte superior. Mientras que la caja de la derecha muestra el efecto inhibitorio de uno de los aislados bacterianos probados (ID C82-15.2), con un halo de inhibición en la parte superior. **B)** Gráfica de las distancias de inhibición medidas (en milímetros) de 18 endófitos que tienen potencial inhibitorio frente a *R. solani*. Aquí se muestran las barras de error y se realizó un ANOVA con prueba de Tukey para detectar diferencias significativas ($p < 0,05$), donde letras compartidas indican que no hay diferencias significativas entre las medias de las distancias de inhibición. **C)** Gráfico de la proporción de endófitos bacterianos (%) que provienen de tubérculos de suelo N y de endófitos bacterianos que vienen de tubérculos de suelo T. Donde también se distingue entre la proporción con potencial inhibitorio y aquella que no tiene el potencial de inhibición. Aquí se utilizó la prueba exacta de Fisher.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajayi, O., y Bradley, C. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67, 3-17. doi: 10.1111/ppa.12733
- Andreote, F., Pereira e Silva, M., Melo, V., y Roesch, L. (2017). The Brazilian Soil Microbiome. En Pylro, V., y Roesch, L. (Eds.), *The Brazilian Microbiome Current Status Perspectives* (pp. 21-39). Suiza: Springer International Publishing AG.
- Benlioglu, B., y Adak, M. (2019). Importance of Crop Wild Relatives and Landraces Genetic Resources in Plant Breeding Programmes. *Journal of Experimental Agriculture International*, 37(3), 1-8. doi: 10.9734/JEAI/2019/v37i330268
- Bradshaw, J., y Ramsay, G. (2016). Potato Origin and Production. En Singh, J., y Kaur, L. (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology* (pp. 1-16). Londres, Inglaterra: Academic Press. Elsevier Inc.
- Buchholz, F., Antonielli, L., Kostić, T., Sessitsch, A., y Mitter, B. (2019) The bacterial community in potato is recruited from soil and partly inherited across generations. *PLOS ONE*, 14(11), e0223691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223691>
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., y Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carrión, V., Pérez, J., Cordovez, V., Tracanna, V., De Hollander, M., Ruiz, D., Mendes, L., Van Ijcken, W., Gomez, R., Elsayed, S., Mohanraju, P., Arifah, A., Van der Oost, J., Paulson, J., Mendes, R., Van Wezel, G., Medema, M., y Raaijmakers, J. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, 366(6465), 606-612. doi: 10.1126/science.aaw9285
- Carter, D., Yellowlees, D., y Tibbett, M. (2007). Autoclaving kills soil microbes yet soil enzymes remain active. *Pedobiologia*, 51(4), 295-299.
- CIP. (s.f.). Datos y cifras de la papa. Centro Internacional de la Papa. <https://cipotato.org/es/potato/potato-facts-and-figures/>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., y Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Devi Y., Meetei, T., y Kumari, N. (2018). Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity and Enzymes: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(6), 952-958. doi: 10.20546/ijcmas.2018.706.113
- Dubey, A., Malla, M., Khan, F., Chowdhary, K., Yadav, S., Kumar, A., Sharma, S., Khare, P., y Khan, M. (2019). Soil microbiome: a key player for conservation of soil health

- under changing climate. *Biodiversity and Conservation*, 28, 2405-2429.
<https://doi.org/10.1007/s10531-019-01760-5>
- Escallón, R., Ramírez, M., y Ñustañez, C. (2005). Evaluación del potencial de rendimiento y de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont. de Bary) en la colección de papas redondas amarillas de la especie *Solanum phureja* (Juz. et Buk.). *Agronomía Colombiana*, 23(1), 35-41. Extraído de
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316951005>
- FAO. (2019). Crops: Potatoes. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- FAO. (2008). The Potato. International Year of the Potato. <http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/diffusion.html>
- Finkel, O., Salas, I., Castrillo, G., Spaepen, S., Law, T., Teixeira, P., Jones, C., y Dangl, J. (2019). The effects of soil phosphorus content on plant microbiota are driven by the plant phosphate starvation response. *PLOS Biology*, 17(11), 1-34.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.300053>
- Gopal, M., y Gupta, A. (2016). Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7(1971), 1-10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01971>
- Gupta, V., Neate, S., y Leonard, E. (1997). *Life in the soil: the relationship between agriculture and soil organisms*. Australia: Cooperative Research Centre for Soil & Land Management.
- Hummer, K., y Hancock, J. (2015). Vavilovian Centers of Plant Diversity: Implications and Impacts. *HortScience*, 50(6), 780-783. doi: 10.21273/HORT SCI.50.6.780
- Hermanová, V., Barta, J., y Curn, V. (2007). Wild Potato Species: Characterization and Biological Potential for Potato Breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 43(3), 73-81. doi: 10.17221/2069-CJGPB
- Jiao, J., Wang, H., Zeng, Y., y Shen, Y. (2005). Enrichment for microbes living in association with plant tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2006), 830-737.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02830.x>
- Joshi, N., y Sickel, F. (2011). A Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files (Version 1.33). Github. <https://github.com/najoshi/sickle>
- Machida, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science*, 65, 26-40. doi: 10.1270/jsbbs.65.26
- Mengist, W., Soromessa, T., y Legese, G. (2020). Method for conducting systematic literature review and meta-analysis for environmental science research. *MethodsX*, 7, 100777. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.100777>
- Morais, T., Asmar, S., Silva, H., Luz, J., y Melo, B. (2018). APPLICATION OF TISSUE CULTURE TECHNIQUES IN POTATO. *Bioscience Journal*, 34(4), 952-969.

- Monteros, C., y Reinoso, I. (2010). Biodiversidad y oportunidades de mercado para las papas nativas ecuatorianas. En X. Cuesta, J. Andrade, E. Yáñez y R. Iván (Coord.), *I Congreso Internacional de Investigación y Desarrollo de Papas Nativas: Memorias* (pp. 15-16). Quito, Ecuador: INIAP/CIP.
- Monteros, C., Yumisaca, F., Andrade, J., y Reinoso, I. (2011). *Cultivares de Papas Nativas Sierra Centro Norte del Ecuador: Catálogo etnobotánico, morfológico, agronómico y calidad*. Quito, Ecuador: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., y Renella, G. (2017). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 68(1), 12-26. doi:10.1111/ejss.4_12398
- Noroña, J., & Tipanquiza, J. (2010). *Evaluación del comportamiento en el cultivo de papa (Solanum tuberosum) variedades "INIAP-Natividad; INIAP-Estela"; versus un testigo, la variedad tradicional "Bologna" en el cantón PAUTE provincia del Azuay* [Tesis de Pregrado, Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenta]. – Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H. (2016). *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version. 2.0-10. CRAN. <https://cran.r-project.org/>
- Pantoja, M. (2013). *Caracterización y Reinserción de diez accesiones de Papa Nativa (Solanum tuberosum) olectadas en Tulcán, Montúfar y Huaca de la provincia del Carchi* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica del Norte] –Repositorio Digital Universidad Técnica del Norte.
- Pérez, J., Carrión, V., De Hollander, M., y Raaijmakers, J. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6(143), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>
- Pérez, F., León, J. y Galindo, N. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(2), 116-139. Extraído de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145001>
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P., y Van der Putter, W. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2002). *El Cultivo de la Papa en Ecuador*. Quito, Ecuador: INIAP-CIP.
- Salas, I. (2019). *isaisg/ochibi*. Github. <https://github.com/isaisg/ohchibi>
- Sanders, E. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments*, 63, e3064. doi: 10.3791/3064

- Santos, L., y Olivares, F. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology*, 26, 100198. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100198>
- Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Hollister, E., Lesniewski, R., Oakley, B., Parks, D., Robinson, C., Sahl, J., Stres, B., Thallinger, G., Van Horn, D., y Weber, C. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmidt, T., y Waldron, C. (2015). Microbial diversity in soils of agricultural landscapes and its relation to ecosystem function. En Hamilton, S., Doll, J., y Robertson, G. (Eds.), *The Ecology of Agricultural Landscapes: Long-Term Research on the Path to Sustainability* (pp. 135-157). Nueva York, Estados Unidos: Oxford University Press.
- Tawfik, G., Surya, K., Fadlelmola, M., Hien, D., Kien, N., Ahmed, A., y Huy, N. (2019). A step by step guide for conducting a systematic review and meta-analysis with simulation data. *Tropical Medicine and Health*, 47(46), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s41182-019-0165-6>
- The Royal Horticultural Society. (2021). Potato black scurf and stem canker. The Royal Horticultural Society. <https://www.rhs.org.uk/advice/profile?PID=744>
- Tidke, S., Kumar, R., Ramkrishna, D., Kiran, S., Kosturkova, G., y Gokare, R. (2017). Current Understanding of Endophytes: Their Relevance, Importance, and Industrial Potentials. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3(3), 43-59. doi: 10.9790/264X-03034359
- Trivedi, P., Schenk, P., Wallenstein, M., y Singh, B. (2017). Tiny Microbes, Big Yields: enhancing food crop production with biological solutions. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 999-1003. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12804>
- Van den Brink, L., y Wutsman, R. (2014). *Rhizoctonia solani* in potatoes and its control. Specific recommendations for seed potato production in Punjab (India). Praktijkonderzoek Plant & Omgeving Wageningen UR. <https://edepot.wur.nl/305202>
- Van der Voort, M., Kempenaar, M., Van Driel, M., Raaijmakers, J., y Mendes, R. (2016) Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecology Letters*, 19(4), 375-382. <https://doi.org/10.1111/ele.12567>
- Wei, Z., Gu, Y., Friman, V., Kowalchuk, G., Xu, Y., Shen, Q., y Jousset, A. (2019). Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. *Science Advances*, 5(9), eaaw0759. doi: 10.1126/sciadv.aaw0759
- Wharton, P., y Wood, E. (2013). *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. University of Idaho Extension. <https://www.extension.uidaho.edu/publishing/pdf/CIS/CIS1198.pdf>

Yourstone, S., Lundberg, D., Dangl, J., y Jones, C. (2014). MT-Toolbox: improved amplicon sequencing using molecule tags. *BMC Bioinformatics*, 15(7), 184. doi: 10.1186/1471-2105-15-284

Zhang, H., Xu, F., Wu, Y., Hu, H., y Dai, X. (2017). Progress of potato staple food research and industry in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2924-2932. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61736-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61736-2)

ANEXOS

ANEXO 1. METODOLOGÍA EXTENDIDA

Protocolo de desinfección de tubérculos

Dos tubérculos por planta se sumergieron en etanol al 70% por 30 segundos, luego se lavaron con dH_2O estéril por 1 minuto, después se colocaron en NaClO al 2,5% con 5 gotas de Tween 80 por 30 segundos y finalmente se realizaron 3 lavados con dH_2O estéril por 1, 3 y 5 minutos, respectivamente.

Protocolo de centrifugación diferencial

Se centrifugaron los tubos Falcon de 50 mL con los tubérculos machucados y el buffer enzimático. Se centrifugó 3 veces a 200 g por 5 minutos, donde tras cada proceso se rescató el sobrenadante y se cambió de tubo, descartando el pellet. Luego se centrifugó una vez a 3000 g por 20 minutos y se rescató el sobrenadante (2 mL por muestra), donde se repartió 1 mL en cada tubo Eppendorf.

Protocolo de PCR de amplicones y purificación

Para la amplificación del gen 16S ARNr (V3-V4) primero se añadieron 2 barcodes y se realizó por triplicado cada PCR. La reacción incluyó los siguientes reactivos: 8 μ dH_2O , 5 μ L de Kapa Buffer A, 5 μ L de Kapa Enhancer, 0.5 μ L de Kapa dNTPs, 0.375 μ L de PNAs, 1.25 μ L de cada primer (se utilizaron 3 primers), 0.2 μ L de Kapa Robust Taq (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachussetts) y 5 μ L de ADN. Mientras que el protocolo del termociclador fue: 95°C por 60 segundos, y 24 ciclos de 95°C por 15 segundos, 78°C durante 10 segundos y 50°C por 30 segundos, y finalmente 72°C durante 30 segundos. Luego se mantuvo a 4°C hasta su purificación. En cambio, para la amplificación del ITS2 las muestras de ADN se diluyeron a 3.5 ng/ μ L y se realizaron reacciones de PCR por triplicado utilizando:

10 ng de ADN, 1 U buffer, 2mM de $MgCl_2$, 200 μ L de dNTPs, 300 nM de cada primer, 0.3% de suero bovino de albúmina, 1 U de buffer y 2 U de DFS-Taq ADN polimerasa (Bioron, Ludwigshafen, Alemania). Mientras que las condiciones del termociclador fueron: 94°C por 2 minutos, 25 ciclos con temperaturas de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Y un paso final de 72°C por 10 minutos. Después de esto se realizó una segunda PCR para añadir los barcodes específicos. Luego de la amplificación de ambas regiones de ADN, los amplicones se amplificaron utilizando el kit AMPure XP que emplea perlas magnéticas (Beckman Coulter, Brea, California). Después se midió la concentración de ADN con Qubit 4 y se usó concentraciones de 10 pM de cada amplicón para su secuenciamiento.

Preparación de buffer enzimático

Un stock de 250 mL contiene: 0.1 % de macerozima, 1% de celulasa, 0.7 M de D-Manitol, 5 mM de MES, 9 mM de cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 65 μ m de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4).

Preparación de medios de cultivo para el aislamiento de endófitos y bioensayos con *R. solani* (recetas para 1L)

- 1/10 TSA (Tryptic Soy Agar) con pH de 7
 - 2.75 g mezcla de Tryptic Soy Broth (TSB)
 - 17.5 g de Agar Noble
 - 20 mg/L de trimetoprim
 - 20 mg/L de ácido nalidíxico
 - 100 mg/L de delvolid
- 1/10 Agar R2A (Reasoner's 2A Agar)

- 1.82 g de mezcla agar R2A
- 13.5 g de Bacto Agar
- 100 mg/L de delvolid
- Agar King's B
 - 38 g de Difco Pseudomonas Agar F
 - 10 g de glicerol
 - 40 mg/L de ampicilina
 - 13 mg/L de cloranfenicol
 - 100 mg/L de delvolid
- Agar Humato de Potasio (HV) con pH de 7.2
 - 5 g de humato de potasio
 - 2 g KNO_3
 - 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
 - 0.5 g KH_2PO_4
 - 18 g de Agar Noble
 - 20 g/L de ácido nalidíxico
 - 20 mg/L de trimetoprim
 - 100 mg/L de delvolid
- TSA
 - 40 g mezcla de Tryptic Soy Agar
 - 100 mg/L de delvolid
- TSB
 - 30 g mezcla de Tryptic Soy Broth
- PDA (Potato Dextrose Agar)
 - 39 g mezcla de Potato Dextrose Agar

**ANEXO 2. EJEMPLOS DE CULTIVOS PUROS DE BACTERIAS ENDÓFITAS
AISLADAS DE LOS TUBÉRCULOS DE SUELO N Y DE SUELO T**



