

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**La vida al servicio de la vida: Bacterias asociadas con la rizósfera
del tomate en el centro de su origen.**

Mariana de Jesús Gallardo Espinoza

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**La vida al servicio de la vida: Bacterias asociadas con la rizósfera del
tomate en el centro de su origen.**

Mariana de Jesús Gallardo Espinoza

Nombre del profesor, Título académico

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

Quito, 17 de diciembre 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: Mariana de Jesús Gallardo Espinoza

Código: 00200328

Cédula de identidad: 0605620343

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre 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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Se conoce que plantas y microorganismos entablan relaciones con el fin del beneficio mutuo, funcionando como un holobionte, capaz de realizar múltiples funciones como la adquisición de nutrientes y la defensa contra patógenos. Sin embargo, a pesar de conocer de estas relaciones, se conoce muy poco acerca de las comunidades que intervienen en ellas y que funciones cumplen en beneficio del hospedador. Además, estas relaciones han cambiado debido a la evolución y distintos procesos de domesticación de cultivos agrícolas. En el caso del tomate, se conoce que la variedad cultivada *Solanum lycopersicum* var. *MoneyMaker*, que actualmente es la más comercializadas a nivel mundial, posee menor variabilidad genética en comparación con su contraparte nativa ancestral *Solanum pimpinellifolium*, haciendo que sea vulnerable ante el estrés biótico o abiótico. Para este caso específico, se consideró que el estudio del microbioma puede brindar la oportunidad de alcanzar hacia una agricultura más sustentable. Sin embargo, posterior a la experimentación en invernadero, con suelos naturales y agrícolas de Loja y Cayambe, sur y centro-norte del Ecuador respectivamente, los análisis de diversidad en base a la región 16S ARNr, demuestran que, no es el microbioma de los diferentes tomates lo que podría marcar la diferencia, sino el microbioma de los distintos suelos analizados, los mismos que dependen de condiciones ambientales e intervención humana. Además, se establece la presencia de los órdenes Rhizobiales, Xanthomonadales, Burkholderiales, Myxococcales, y Sphingobacteriales como comunidades bacterianas estables en el microbioma de la rizósfera del tomate. Se propone realizar más investigaciones para descifrar cómo estos órdenes desempeñan un papel en el desarrollo de tomate, o identificar bacterias benéficas que brindan resistencia contra patógenos.

Palabras clave: Rizósfera, tomate, centro de origen, 16S ARNr, bacterias, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

It is known that plants and microorganisms engage relationships with the purpose of mutual benefit, functioning as a *holobiont*, thereby performing various functions such as acquiring nutrients and protection against pathogens. Despite knowing these relationships, very little is known about the communities that associate to plants and what functions they perform for the benefit of their hosts. Moreover, these relationships have changed due to the evolution and subsequent stages of domestication of various agricultural crops.

In tomato, the crop of interest of the present study, it is known that the cultivated variety *Solanum lycopersicum* var. *Moneymaker*, which is currently the most popular variety worldwide, has less genetic variability compared to its native ancestral species *Solanum pimpinellifolium*, making it vulnerable to biotic or abiotic stresses. The study of the microbiome is considered an opportunity to achieve a more sustainable agriculture. After analyzing the microbial diversity of samples from a controlled greenhouse experiment, focussing on the region 16S rRNA of roots of tomato planted in natural and agricultural soils of Loja and Cayambe (south and center-north of Ecuador), we demonstrate that it is not the microbiome of the different tomato genotypes that differently influences the microbiome, but the microbiome of the various soils, which depends on environmental conditions and human intervention. We confirmed the presence of the orders Rhizobiales, Xanthomonadales, Burkholderiales, Myxococcales, and Sphingobacteriales, which are established as an integral part of the bacterial communities in the microbiome of the tomato rhizosphere. Further research is encouraged to decipher how these bacterial groups play a role in tomato development and fitness, and to identify beneficial bacteria that could provide resistance against pathogens.

Keywords: Rhizosphere, tomato, center of origin, Ecuador, 16S rRNA, bacteria, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum lycopersicum*.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Interacciones entre el microbioma y las plantas	12
1.2. El tomate en Ecuador	13
1.3. Bacterias como parte del microbioma presentes en la rizósfera del tomate	14
1.4. Justificación del estudio	15
2. MÉTODOS	16
2.1. Descripción de elementos colectados	16
2.2. Condiciones del invernadero	16
2.3. Diseño experimental	16
2.4. Extracción del ADN rizosférico	17
2.5. Análisis bioinformático de secuencias 16S ARNr de las rizósferas de tomates nativos y modernos en suelos agrícolas y nativos de Loja y Cayambe.....	17
2.6. Análisis de Alpha y Beta diversidad.....	18
2.7. Análisis taxonómicos.....	18
3. RESULTADOS	19
3.1. Análisis de diversidad.....	19
3.2. Análisis taxonómico	20
3.3. Análisis diferencial de abundancia con Gneiss.....	21
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIONES	27

6. TABLAS	28
7. FIGURAS	29
Referencias bibliográficas.....	33
ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índices de diversidad alpha para los distintos parámetros de estudio.....	28
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emperor Plots que analizan la diversidad Beta de acuerdo con cuatro índices de estudio (de arriba hacia abajo): <i>Unweighted unifracs</i> , <i>Weighted unifracs</i> , <i>Jaccard</i> y <i>Bray Curtis</i>	29
Figura 2. Porcentaje de filos halladas en suelos agrícolas y naturales de las ciudades de Loja y Cayambe.	30
Figura 3. Microorganismos predominantes pertenecientes a los tratamientos “MM,” “PP,” y “NA” en suelos Agrícolas y Naturales de las ciudades de Cayambe y Loja. El tamaño de cada círculo represente la abundancia de cada taxón y el color diferencia los filos encontrados....	31
Figura 4. Gráficas de proporción donde se comparan especies presentes en los tratamientos “MM” y “PP” en suelos Agrícolas y Naturales de las ciudades de Cayambe y Loja.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Gráficas de proporción dependiendo del sitio de análisis.....	37
ANEXO 2: Gráficas de proporción dependiendo del tipo de suelo analizado	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Interacciones entre el microbioma y las plantas

En la última década, las comunidades microbianas han sido de gran interés en el estudio de organismo eucariotas y su funcionamiento (Cordovez et al., 2019). Principalmente, debido a que los microorganismos son esenciales para mantener la vida en la tierra (Turner et al., 2013).

Se conoce que, en plantas, las comunidades microbianas son capaces de expandir las habilidades, tanto genómicas como metabólicas, de sus huéspedes, haciendo posible que estos puedan realizar funciones vitales, como la adquisición de nutrientes o ser partícipes activos de ciertos ciclos biogeoquímicos (Cordovez et al., 2019). Es por esta razón que se considera que las plantas y su microbioma están entrelazadas, funcionando como un holobionte, donde es necesario comprender la dependencia existente de ambas partes para entender las interacciones presentes, y el ensamblaje de estas (Bandyopadhyay et al., 2017). Este proceso, que puede ser denominado co-evolución simbiótica, ha permitido el desarrollo de estrategias que contrarresten el estrés biótico y abiótico (Gopal & Gupta, 2016).

Todos los tejidos de la planta albergan a una comunidad microbiana específica, el presente proyecto se centra en la rizósfera. Se denomina rizósfera a la región del suelo que se encuentra próxima a las raíces, influenciada por la planta y el suelo aledaño, su tamaño o forma no se puede definir ya que varía en cada especie, pero se conoce que consiste en un gradiente de propiedades físicas, químicas y biológicas que cambian a lo largo de toda la raíz (Trivedi et al., 2020). Además, en contraste con otros microhábitats, se caracteriza por una alta abundancia microbiana (Berg et al., 2014). Sin embargo, como se menciona previamente, el microbioma depende en gran medida de su huésped, el mismo que también debe ser caracterizado.

1.2. El tomate en Ecuador

La planta de tomate es un arbusto que pertenece a la familia *Solanaceae* (Rehman et al., 2020). Es cultivada de forma continua para el consumo de sus frutos (López, 2017). El tomate es una especie que, debido a su alta demanda a nivel mundial, presenta una gran cantidad de variedades, capaces de crecer en un amplio rango de hábitats, con morfologías distintas, tanto en la planta como en el fruto, donde se observan diversas formas e intensidad de color (Rehman et al., 2020). Su tallo es de color verde y grueso, aunque es más delgado en la superior. Las hojas del tomate son pinnadas y compuestas y, además, están dispuestas de manera alternada sobre el tallo. En cuanto a sus flores, su cáliz y corola constan de cinco pétalos color amarillo y de cinco o más sépalos que se agrupan en inflorescencias. El tomate como fruto es una baya polilocular que inmaduro tiene una tonalidad verde y cuando madura alcanza distintas tonalidades entre el amarillo y el rojo (López, 2017).

La cualidad que más ha caracterizado al tomate tras su proceso de domesticación ha sido su gran tamaño (Klee & Resende, 2020). Se conoce que el tomate se originó en la región Andina de Sudamérica, específicamente la zona que abarca a Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú (Bai & Lindhout, 2007). Este tomate nativo (*Solanum pimpinellifolium*) es una planta perenne que produce numerosos frutos pequeños y redondos, y es comúnmente conocido como el tomatillo de Loja. Evidencia histórica muestra que el primer punto de divergencia de esta especie (*S. pimpinellifolium*) ocurrió en Perú y Ecuador, donde se llega a conocer a una nueva variante criolla (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) (Klee & Resende, 2020). Estas especies, son también conocidas como tomate Cherry, y sus frutos pueden llegar a ser tan grandes como una pelota de golf o tan pequeños como la punta del pulgar (Renuka et al., 2014).

Ejemplares de estas dos especies se han encontrado no solo a lo largo de Sudamérica, sino también en Centro América, específicamente en México, donde se cree que tuvo lugar un

primer evento de domesticación para posteriormente regresar a Sudamérica y someterse a otro evento de domesticación hasta lograr las características deseadas que conocemos hoy en día como tomates modernos *Solanum lycopersicum*, cuya variedad *MoneyMaker* es una de las variedades más populares en el mundo (Klee & Resende, 2020). Comparado con el reservorio de especies nativas, esta especie cultivada se considera genéticamente pobre, ya que se estima que contiene menos del 5% de la variación alélica presente en sus parientes salvajes después de miles de años de fitomejoramiento (Bai & Lindhout, 2007).

1.3. Bacterias como parte del microbioma presentes en la rizósfera del tomate

Las plantas proporcionan una multitud de nichos para el crecimiento y proliferación de una diversidad de microorganismos (Trivedi et al., 2020). Después del primer contacto que una planta tiene con microorganismos, algunos son capaces de colonizar la planta y sobrevivir por transferencia horizontal. También existe la posibilidad de que estos microorganismos puedan transferirse de manera vertical, desde la planta a su progenie (Berg et al., 2014). El proyecto presentado en este reporte se centra en bacterias, algunas de ellas son patógenas y causan enfermedades, mientras otras, promueven el crecimiento de la planta. Sin embargo, en muchos casos no se ha reconocido la función que cumplen ciertas comunidades para con el huésped (Dong et al., 2019).

Se conoce que las bacterias asociadas a las plantas son filogenéticamente diversas (Berg et al., 2014). Además, existen muchas variables como el huésped, la ubicación geográfica y condiciones ambientales, que dificultan generalizar la composición de cualquier microbioma. Sin embargo, estudios previos en distintas partes del mundo permiten esclarecer un poco el panorama. Como parte del microbioma central de la rizósfera en tomates se ha presentado a tres filos principales: Proteobacteria, Bacteroidetes y Acidobacteria (Cheng et al., 2020). En Asia, dentro de Proteobacteria, las subdivisiones α y β están presentes en mayor abundancia (Kim et al., 2006). Sin embargo, en suelo centroamericano se ha establecido a los Firmicutes

como filo dominante (Cordero et al., 2012). Un estudio realizado en Ecuador muestra a Proteobacteria como filo principal y a *Enterobacteriaceae* como grupo característico (Obando, 2020).

1.4. Justificación del estudio

El estudio del microbioma en plantas ha propiciado el desarrollo de estrategias para mejorar el crecimiento y la salud de sus huéspedes (Cordovez et al., 2019). Esto, en conjunto con la manipulación del microbioma ha representado una oportunidad para conocer sobre los alcances de estas interacciones. Se ha visto el potencial que posee el microbioma para aumentar la resistencia de una planta, además de reducir la emisión de gases de efecto invernadero, generando una agricultura sustentable y reduciendo a su vez los insumos químicos que suelen ser empleados (Turner et al., 2013).

El presente proyecto forma parte de la iniciativa “Back to the Roots” (De vuelta a las raíces) y tiene como finalidad dar continuidad al estudio del microbioma presente en la rizósfera de tomate, nativo y comercializado, cultivado en suelos nativos y agrícolas de los Andes en la sierra ecuatoriana. Esto, realizado mediante el análisis de secuencias obtenidas a partir de experimentos realizados en invernadero y con las cuales se busca identificar posibles comunidades cuyas interacciones puedan beneficiar a los cultivos de tomate, disminuyendo el uso de fertilizantes y pesticidas químicos.

2. MÉTODOS

2.1. Descripción de elementos colectados

En las provincias de Loja y Pichincha, respectivamente en el sur y central-norte de Ecuador, se realizó la colecta de 50 kg de suelo. En Zapotillo (Loja) se reportó el crecimiento natural de tomate nativos (*S. pimpinellifolium*), mientras que en el caso de Cayambe (provincia Pichincha), se recogió suelo de zonas no perturbadas. Además, se colectó muestras de suelo agrícola en zonas de cultivo de papas en Cayambe y tomates en Loja (ambos miembros de la familia *Solanaceae*) (Chanco, 2020). En cada ubicación se colectó muestras pertenecientes a la zona de la rizósfera y también al sector circundante, como suelos testigo (*Bulk soil*). Adicionalmente, se seleccionaron semillas de plantas de tomate que se cultivan en suelos agrícolas (*S. lycopersicum* var. *moneymaker*) y también semillas de la especie nativa que crece naturalmente en el sur del Ecuador (*S. pimpinellifolium*) (Chanco, 2020).

2.2. Condiciones del invernadero

La parte experimental se llevó a cabo en el invernadero del campus de la USFQ en Cumbayá del equipo de Dr. Antonio León-Reyes con condiciones controladas como luz natural por 12 horas y las siguientes 12 horas en oscuridad. La temperatura se mantuvo igual o por encima de los 22°C.

2.3. Diseño experimental

Las muestras de suelo fueron secadas por 7 días y posteriormente tamizadas en una malla de 2 mm para colocar 350 g de suelo humedecido (10% p/v) en macetas. Además, se preparó macetas que contenían únicamente suelo testigo. Las semillas se plantaron a 1 cm de profundidad y se cubrió las macetas con un plástico transparente durante la primera semana durante el periodo de germinación (Chanco, 2020). Después de un periodo de 5 semanas, donde se monitoreo y controló el crecimiento de 32 semillas de tomate nativo (*S. pimpinellifolium*) y

32 semillas de tomate moderno (*S. lycopersicum* var. *moneymaker*), se sembró en cada grupo de esos mismos suelos, la mitad de las semillas de tomate nativo y la otra mitad de tomate moderno (Chanco, 2020), generando tres variables de estudio: “Sitio” (Cayambe y Loja), “Tipo de Suelo” (Agrícola y Nativo) y “Tratamientos.” Este último basado en la variedad de tomate que produjo la activación del microbioma (primera letra) y la variedad que fue introducida en ese suelo después, obteniendo estas combinaciones: MM (2x *S. lycopersicum* var. *moneymaker*, MP (*S. lycopersicum* var. *moneymaker* / *S. pimpinellifolium*), PP (2 x *S. pimpinellifolium*), PM (*S. pimpinellifolium* / *S. lycopersicum* var. *moneymaker*). En esta variable se agregó las siglas NA que corresponden a las muestras de suelo testigo y que en el invernadero se mantuvieron como suelos a los que no se les aplicó ningún tratamiento.

2.4.Extracción del ADN rizosférico

Para la extracción de ADN rizosférico, se separó las plantas de las macetas y se cortó el cuello de la raíz, separándola del tronco. Estas raíces se colocaron en tubos Falcon (15 ml) con una solución *LifeGuard Soil Preservation* (Qiagen USA) siendo almacenados a -20°C con el fin de conservar el material genético. Mismo proceso se siguió con el *Bulk soil* (Chanco, 2020). Posteriormente, se sometieron las muestras a un proceso de lisis mecánica, usando esferas de granate, seguido de un método de purificación de ADN usando columnas del kit *DNeasy PowerSoil* (Qiagen, USA).

2.5.Análisis bioinformático de secuencias 16S ARNr de las rizósferas de tomates nativos y modernos en suelos agrícolas y nativos de Loja y Cayambe

Para el proceso de secuenciación se analizaron las regiones hipervariables V3 y V4 de los genes 16S ARNr (341F y 805R) con la finalidad de caracterizar las comunidades bacterianas (Chanco, 2020). La secuenciación se realizó en la empresa Baseclear (Leiden, Países Bajos), empleando la plataforma MiSeq Illumina. Los archivos FASTAQ obtenidos (*.filt.fastq.gz) se analizaron utilizando la plataforma bioinformática QIIME 2 para

demultiplexear y posteriormente eliminar secuencias de baja calidad (*denoising*) siguiendo el pipeline DADA2. Mientras tanto, se procedió a validar la Metadata con ayuda de la extensión Keemei en las hojas de cálculo de Google.

Previo a los análisis de diversidad y taxonomía se realizó una filtración, donde se eliminaron secuencias de cloroplastos y mitocondrias que pudieran influenciar en los resultados, centrándose únicamente en bacterias y archaeas, que son el objetivo del presente estudio.

2.6. Análisis de Alpha y Beta diversidad

Empleando el tutorial “*Moving Pictures*” de la plataforma QIIME 2 (<https://qiime2.org/>), se obtuvo la diversidad Alpha y Beta. Previo a este proceso se alinearon las secuencias para construir un árbol filogenético sin una raíz, donde se buscaba únicamente relacionar las secuencias. Para los análisis de Alpha diversidad se estudiaron cuatro parámetros: “Sitio” (Cayambre y Loja), “Tipo de suelo” (natural y agrícola) y “Tratamiento” practicado en el invernadero (MM, MP, PP, PM y NA) usando los índices *Faith's PD*, *Evenness*, *Observed features* y *Shannon*. Mientras que, en los análisis de Beta diversidad se estudiaron los mismos parámetros usando los índices *Unweighted Unifrac*, *Weighted Unifrac*, *Jaccard* y *Bray Curtis*.

2.7. Análisis taxonómicos

Para obtener los datos taxonómicos de las secuencias se empleó el clasificador *GreenGenes* (<https://greengenes.secondgenome.com/>) que contiene la base de datos 16S ARNr. Estos datos se combinaron con la tabla de frecuencias en el software R, y con la herramienta web *TreeMap*, se elaboraron gráficas donde se presenta la diversidad taxonómica hasta su máximo nivel de identificación. Adicionalmente se realizaron análisis de abundancia diferencial con Gneiss, donde se empleó un pipeline proveniente de QIIME2, estudiando todos los parámetros antes presentados.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de diversidad

En cuanto a la diversidad Alpha, se estudiaron cuatro índices: *Faith's PD*, *Evenness*, *Observed features* y *Shannon*, en la **Tabla 1** se presentan los valores H y p de cada parámetro (Sitio, Tipo de suelo y Tratamiento) aplicado a estos índices. A partir de estos análisis se puede determinar que la diversidad filogenética es significativamente diferente dependiendo del tipo de suelo que se analice ($H=12.34$ y $p=4 \times 10^{-4}$), siendo Cayambe el sitio que presentó valores mayores de riqueza. En cuanto a homogeneidad, se establece que esta varía en función de los tratamientos analizados ($H=19.53$ y $p=6.2 \times 10^{-4}$). Sin embargo, esta diferencia significativa se debe a la presencia del *Bulk soil* (suelo testigo), o suelo sin tratamiento "NA." Los datos estadísticos obtenidos de las comparaciones entre los distintos tratamientos y el suelo al que no se le aplicó ninguno si muestran diferencias significativas ($p > 0.05$ en todos los casos). Sin embargo, al analizar los datos obtenidos entre tratamientos, no se encontró significancia estadística. Lo mismo ocurre con este parámetro al analizar el índice de Shannon ($H=14.14$ y $p=6.9 \times 10^{-3}$), donde las diferencias se ven al comparar cada suelo con tratamientos con el *Bulk soil*. Adicionalmente, este índice nos indica que existen diferencias significativas de acuerdo con el tipo de suelo estudiado ($H=4.16$ y $p=0.04$) siendo el suelo Agrícola el que presenta una mayor diversidad.

La diversidad beta se determinó por medio de análisis estadísticos PERMANOVA, donde se busca establecer si las distancias dentro de un grupo son significativamente similares entre sí, que al compararlas con los datos de otro grupo. En la **Figura 1** se presentan los distintos Emperor plots obtenidos de cada parámetro en cada uno de los índices analizados. Aquí se puede observar que los datos son explicados de mejor manera al analiza las medidas de distancia *Weighted Unifrac* ($V=56.98\%$) que consideran la filogenia para determinar si

existe diferencias en la estructura de una comunidad. En este índice se establecieron diferencias estadísticamente significativas, tanto en el parámetro de sitio de muestreo ($p=0.001$ y pseudo- $F=12.86$), como al estudiar el tipo de suelo ($p=0.001$ y pseudo- $F=7.56$). Sin embargo, en la figura se evidencia de manera más específica, únicamente los subgrupos, que se forman entre Cayambe y Loja (parámetro “Sitio”). En los índices *Unweighted Unifrac* y *Jaccard* ($V=28.71\%$ y $V=10.67\%$ respectivamente) se evidencian patrones similares en todos los parámetros, mostrando una clara subdivisión dependiendo del sitio y del tipo de suelo analizado, mismas diferencias que se encontraron como significativas en los análisis estadísticos ($p=0.001$ y pseudo- $F>2.5$ en todos los casos). Al analizar el índice *Bray Curtis* se encontraron las mismas diferencias estadísticas presentadas anteriormente. Sin embargo, al igual que en el índice *Weighted Unifrac*, de manera visual únicamente se puede observar las diferencias en cuanto a sitio de muestreo.

A partir de los análisis, tanto de alpha, como de beta diversidad se determinó que los tratamientos empleados para el presente experimento (“MM”, “MP”, “PM” y “PP”) son significativamente diferentes en comparación con el suelo testigo o *Bulk soil*, denominado “NA”(en beta diversidad $p=0.001$ y pseudo- $F>2.5$ en todos los casos) pero no son distintos entre sí, razón por la cuál, para los análisis taxonómicos posteriores se consideró únicamente 2 de los tratamientos (“MM” y “PP” considerados puros porque se activo el suelo y se trasplantó la misma especie de tomate en ambos casos) y el control o suelo testigo “NA.”

3.2. Análisis taxonómico

Posterior a la generación del árbol filogenético, se realizaron los análisis taxonómicos enfocándose principalmente en: filo, familia, género y especie. En la **Figura 2** se puede apreciar la conformación a nivel de filo de la microbiota de acuerdo a los parámetros establecidos como variables para este estudio: “Sitio,” “Tipo de suelo” y “Tratamiento”. Existe una clara distinción entre el suelo testigo y los tratamientos estudiados. Aquí se observa que el

tratamiento “MM” del suelo agrícola de Cayambe se encuentra dominado por el filo Firmicutes (33,36%), seguido de Proteobacteria (29,74%) y Actinobacteria (14,57%). El tratamiento “PP” del mismo tipo de suelo de la zona mostró ligeras diferencias, siendo dominado por el filo Proteobacteria (29,15%), seguido de Firmicutes (24,04%) y Actinobacteria (20,59%). Sin embargo, el suelo testigo de este mismo sector está dominado por Proteobacteria (32,82%) y Actinobacteria (25,08%). Comportamientos similares se observan al analizar los tratamientos y el *Bulk soil* (“NA”) de suelos naturales en la misma ciudad. Al analizar los suelos de Loja se observa un patrón similar de distribución y diversidad.

Es importante recalcar la presencia de filos que están presentes pero en bajo porcentaje, incluso considerándose únicos, como el filo Cyanobacteria (1,33%) presente únicamente en el tratamiento “MM” de suelo natural en Loja.

La **Figura 3** muestra a los microorganismos presentes en el microbioma rizosférico de acuerdo al sitio, tipo de suelo y tratamiento empleado, en su máximo nivel de identificación, donde los tamaños de los círculos son proporcionales a su abundancia. En todos los suelos la composición del filo Firmicutes es similar, dominado por especies como *Bacillus sp*, *B. flexus* y *B. fumarioli*. Siendo el único filo que presenta especies constantes en todos los suelos analizados.

3.3. Análisis diferencial de abundancia con Gneiss

En la **Figura 4** se presentan proportion plots que tiene como finalidad identificar taxones que podrían estar explicando las diferencias presentes en las rizósferas de *S. pimpinellifolium* (PP) y *S. lycopersicum* var. *Moneymaker* (MM) dependiendo del sitio y tipo de suelo utilizado en el experimento. En cada gráfica se analizan veinte especies encontradas.

Al analizar los suelos de Loja, la proporción de los microorganismos es mayor en el tratamiento MM, predominando *Pseudoxanthomonas mexicana* en el suelo agrícola. Mientras que, en el suelo nativo de Loja predominan tres especies del género *Bacillus*.

En el suelo agrícola de Cayambe existe una diferencia más marcada, ya que ninguno de los microorganismos analizados es compartido entre los tratamientos. A diferencia del suelo natural donde, en el tratamiento PP predomina *L. amylolyticus*. Mientras que, en el tratamiento PP predominan dos variedades de *B. flexus*.

Adicionalmente, la sección A de los anexos presenta proportion plots donde se analizan las diferencias entre los tipos de suelo (natural y agrícola) dependiendo del sitio (Loja o Cayambe). Donde se determinó que, el suelo natural de Loja tiene una mayor proporción de la especie *B. fumarioli*, seguido de miembros de las familias *Micromonosporaceae*, *Bradyrhizobiaceae* y *Rodospirillaceae*. Mientras que, el suelo Agrícola está dominado por el género *Bacillus*. Aquí también destaca la presencia del género *Devosia*, de la familia *Comamonadaceae* y del filo Gemmatimonadetes, que no se encontraron en suelo natural.

Al analizar el suelo natural de Cayambe se determinó que la especie *B. flexus* se encuentra en mayor proporción, seguido de miembros de la familia *Gaiellaceae*. A diferencia del suelo agrícola donde el taxón que pertenece al género *Rhodoplanes* se encuentra en mayor proporción, seguido de *Gaiellaceae*.

Adicionalmente, la sección B presenta proportion plots donde se comparan los sitios de análisis dependiendo de los tipos de suelo. Estos resultados presentan diferencias más marcadas en cuanto a taxones presentes entre Loja y Cayambe. Tanto en suelo agrícola y natural, el suelo de Loja tiene gran presencia del género *Bacillus*. Sin embargo, los taxones encontrados no pudieron ser identificados a nivel de especie. Mientras que, en los suelos de Cayambe se observa una mayor diversidad de taxones presentes.

4. DISCUSIÓN

El presente estudio es uno de los primeros que analiza la composición del microbioma de la rizósfera de tomate nativo *S. pimpinellifolium* en su suelo de origen y en suelo agrícola de la provincia de Loja, y en suelo no-nativo y agrícola de Cayambe, para comparar estos resultados con los obtenidos del análisis de la especie cultivada y comercializada *S. lycopersicum* var. *Moneymaker* en estos mismos suelos.

Al analizar la diversidad Alpha y Beta (**Tabla 1** y **Figura 1**) se encontró un patrón común, tanto en el tipo de suelo, como en el sitio analizado. Los análisis estadísticos (valor p y pseudo-F) demuestran diferencias entre los suelos de Loja y Cayambe, siendo estos últimos los que presentan mayor diversidad bacteriana. Al haber utilizado suelos del sur y centro-norte del Ecuador, una de las principales diferencias presentes es el clima de ambos sectores. Esto influencia de manera directa en las condiciones de suelo, como humedad, temperatura y contenido de nutrientes, son factores que afectan a la presencia de microorganismos (Singh, Pandey & Singh, 2011). Este último factor ha sido analizado por Pamela Chanco (2020), donde se evidenció que, en suelos de Cayambe, la reserva de Nitrógeno y capacidad de suministro de este es significativamente superior al lumbral. Lo mismo ocurre con el Potasio, ambos se consideran importantes macronutrientes empleados en el crecimiento de la planta. Sin embargo, necesitan estar disponibles para la planta, y para esto se requiere de la presencia de ciertos grupos de microorganismos (Meena et al., 2016).

De igual forma se establece que los suelos no perturbados presentan claras diferencias, en comparación con los suelos empleados en la agricultura. Estos últimos contienen mayor diversidad. Los suelos no perturbados, se consideran ecosistemas naturales, sitios donde las plantas silvestres o nativas dependen de las comunidades asociadas con ellas para la obtención de nutrientes y defensa en contra de patógenos. Es aquí donde la literatura reporta que, con el

paso del tiempo evolutivo, se generan relaciones estrechas con los microorganismos. A diferencia de los ecosistemas agrícolas, donde la intervención del hombre en la manipulación de suelos y cultivos, hacen que exista una mayor diversidad de microorganismos que, en muchos casos, no se conoce si guardan o no relación con el desarrollo de la planta (Mariotte et al., 2018).

A partir de los análisis taxonómicos se establece de manera general que existen diferencias entre la composición del microbioma bacteriano presente en la rizósfera y el que está presente en el suelo testigo. Antoniou et al. (2017) describieron el “efecto rizósfera” donde se explica que esta diferencia se debe a la presencia de compuestos orgánicos que exuda la raíz en las zonas del suelo aledaño (rizósfera) conduciendo a la atracción de mayor abundancia de microorganismos que interactuen en este sector.

Los filos comunes (Firmicute, Proteobacteria y Actinobacteria), presentes en la rizósfera de los tomates analizados coinciden con la reportado en estudios de ciertas variedades de tomate, incluyendo el tomate cultivado presentado en este estudio. Esto apoya la hipótesis que sugiere la existencia de comunidades bacterianas estables, presentes en la rizósfera del tomate. Entre los órdenes reportados y que coinciden con esta investigación están: Rhizobiales, Xanthomonadales, Burkholderiales, Myxococcales, y Sphingobacteriales (Chang et al., 2020).

Sin embargo, pese a que pueden existir comunidades bacterianas estables en las rizósferas analizadas, los porcentajes de abundancia varían dependiendo del tipo de suelo y la zona geográfica que se analiza. Esta variación se atribuyó principalmente al suelo y su contaminación, siendo este un factor determinante en la conformación del microbioma en esta zona (Antoniou et al., 2017).

A partir de los análisis taxonómicos (**Figura 4**) se evidencia la presencia de taxones que podrían explicar la diferencias entre los tipos de tomate en los distintos suelos y zonas analizados. Sin embargo, estos taxones se encuentran en proporciones muy bajas, razón por la

cuál se prefirió estudiar las diferencias taxonómicas enfocándose en el suelo, factor mencionado previamente. Aquí se establece la presencia la género *Bacillus* en todos los suelos. Sin embargo, en Loja, tanto en suelo agrícola como natural (**Anexo B**), este género predomina. Este género, junto con *Pseudomonas* (presente en suelos de Cayambe), se consideran modelos a partir de los cuales se ha estudiado la interacción benéfica que existe entre cepas de estos géneros y las plantas. (Berg et al., 2014). A pesar de la limitada existencia de estudios en tomates, en otras especies, ciertas especies del género, como *B. subtilis*, se consideran promotoras del crecimiento vegetal, gracias a su capacidad de interacción con otros microorganismos (Sivasakthi, Usharani & Saranraj, 2014).

En los suelos naturales de Loja (**Anexo B**), la familia *Micromonosporaceae* se ha reportado que tiene miembros capaces de controlar patógenos de plantas y cuya presencia se registra en suelos con alto contenido de arcilla que tiene presencia de CO₂ (Raut et al., 2018). También, se ha reportado que miembros de la familia *Bradyrhizobiaceae* intervienen en el ciclo del nitrógeno, capaces de fijar y volver disponible el nitrógeno presente en los suelos para el aprovechamiento de las plantas (Souza et al., 2014). De igual forma, con la familia *Rhodospirillaceae*, que contiene microorganismos, en su mayoría fototróficos, capaces de asimilar compuestos orgánicos simples empleados en el crecimiento de las plantas (Biebl & Pfennig, 1981).

En los suelos agrícolas de Loja se registro la presencia del filo Gemmatimonadetes, mismo que al ser un taxón muy grande se conoce que contiene cepas, tanto benéficas, como patógenas. Sin embargo, del género *Devosia*, se conce que contiene microorganismos capaces de fijar el nitrógeno y transportar nutrientes a la planta por medio de colonización por epífitas en el rizoplano (superficie de la raíz) (Balach et al., 2007).

Tanto en los suelos agrícolas como naturales de Cayambe se encontró un predominio de la familia *Gaiellaceae*, que es poco conocido. Según la literatura, su presencia podría

evidenciar la existencia de metales o metaloides en el suelo, que son metabolizados por este taxón y evitando el contacto de estos con las plantas (Sun et al., 2018). Sin embargo, en suelo agrícola, el género *Rhodoplanes* ha demostrado que contiene bacterias posible fijadoras de nitrógeno (Gkarmiri et al., 2017).

Es importante recalcar que la literatura que sustentan los resultados presentados en el este estudio se basa en el análisis del comportamiento de microorganismos en la rizósfera de diferentes especies vegetales, y que en muchos casos, se estudió únicamente a cepas cultivables en laboratorio. Se propone realizar más investigaciones para descifrar cómo estas bacterias se asocian con las raíces de tomates, y cómo desempeñan su papel en el desarrollo de tomate. Además, sería recomendable empezar un biobanco aislando bacterias desde la rizosfera y endosfera de las raíces de tomate, para poder identificar y caracterizar bacterias benéficas que podrían brindar resistencia contra patógenos.

5. CONCLUSIONES

Como se mencionó previamente, al ser este uno de los primeros estudios que se enfoca en la rizósfera del tomate nativo en su suelo de origen en el sur del Ecuador, la comparación con otros estudios ha sido un proceso arduo para el cual se ha tomado en cuenta, no solo miembros de familia *Solanaceae*, sino también especies modelo como *A. thaliana*. De modo que, toda la información obtenida es un gran paso en la investigación de microbiomas y aún quedan por explorar nuevos aspectos sobre la diversidad filogenética de los microorganismos asociados a la planta y su funcionalidad en el desarrollo del tomate y la protección contra plagas. Se concluye que, las diferencias en el microbioma de la rizósfera del tomate se deben al tipo de suelo, sus características, composición y contenido de nutrientes, mas no al genotipo de la planta como se creía previamente. Denotando claras diferencias entre los suelos de Cayambe y Loja, y también entre el tipo de uso de los suelos: Agrícolas y naturales.

Adicionalmente, se estableció que la rizósfera presente una mayor abundancia de microorganismos que el *Bulk soil* debido a los exudados de la raíz, cuya composición es un factor determinante para la formación de interacciones planta-microorganismos. A partir de la caracterización de la rizósfera, se determinó la presencia de comunidades bacterianas estables pertenecientes a los órdenes Rhizobiales, Xanthomonadales, Burkholderiales, Myxococcales, y Sphingobacteriales presentes en la rizósfera, tanto del tomate nativo como del cultivado y comercializado. Sin embargo, la abundancia diferencia demostró la presencia que taxones que podrían explicar la dismilitud entre el crecimiento de ambas especies de tomate analizado. Se espera que en el futuro se estudie a profundidad estos taxones para lograr un mayor nivel de identificación y caracterización de su funcionalidad específicamente en asociación con tomates.

6. TABLAS

Tabla 1. Índices de diversidad alpha para los distintos parámetros de estudio

Diversidad		Alpha						
Índice	Faith's PD		Evenness		Observed features		Shannon	
Test Estadístico	H	Valor P	H	Valor P	H	Valor P	H	Valor P
Sitio	12.34	$4 * 10^{-4}$	1.54	0.21	15.57	$8 * 10^{-5}$	0.55	0.46
Tipo de suelo	0.25	0.62	1.89	0.17	8.06	$4.5 * 10^{-3}$	4.16	0.04
Tratamiento	2.77	0.6	19.53	$6.2 * 10^{-4}$	6.6	0.16	14.14	$6.9 * 10^{-3}$

7. FIGURAS

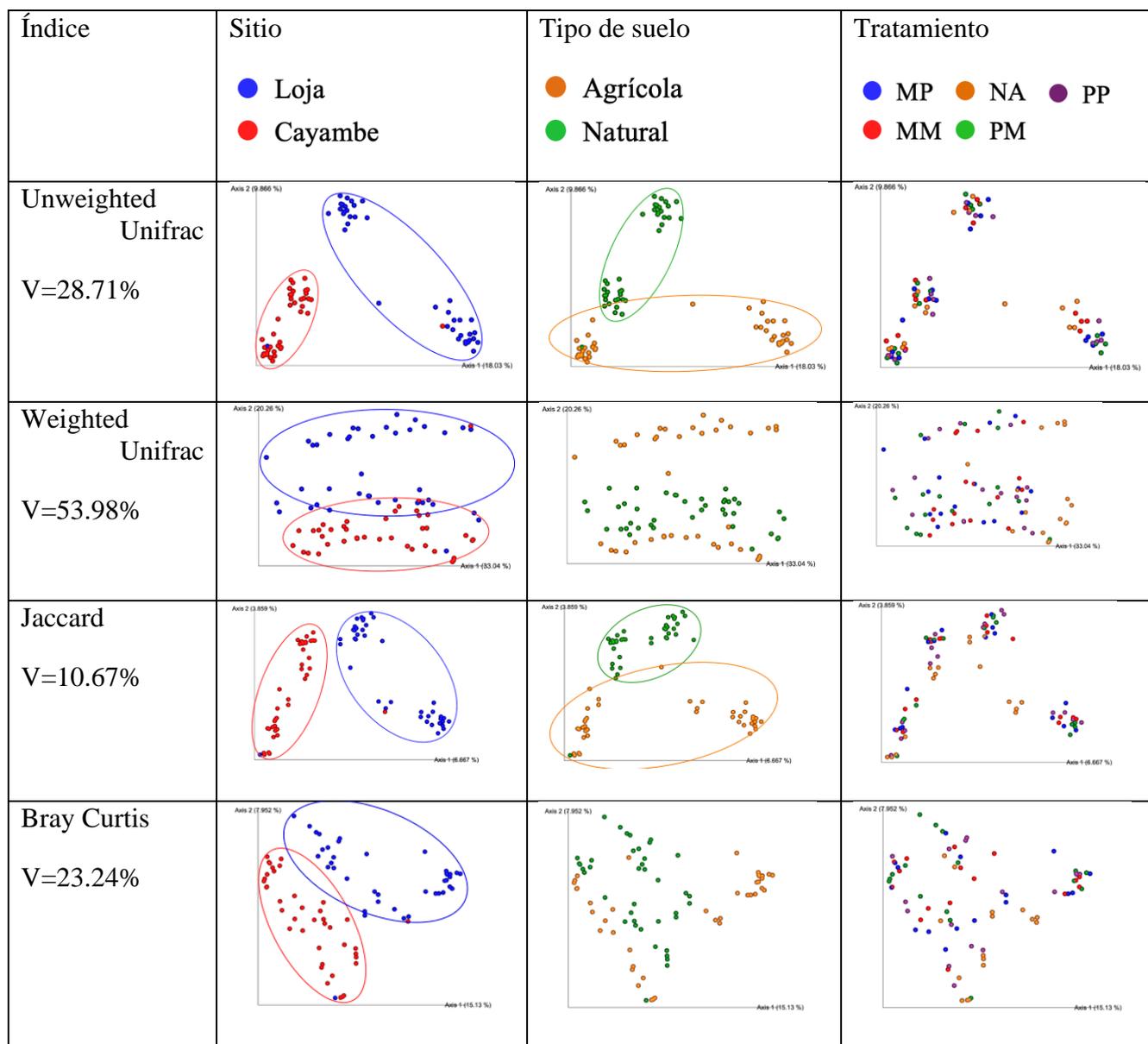


Figura 1. Emperor Plots que analizan la diversidad Beta de acuerdo con cuatro índices de estudio (de arriba hacia abajo): *Unweighted unifrac*, *Weighted unifrc*, *Jaccard* y *Bray Curtis*.

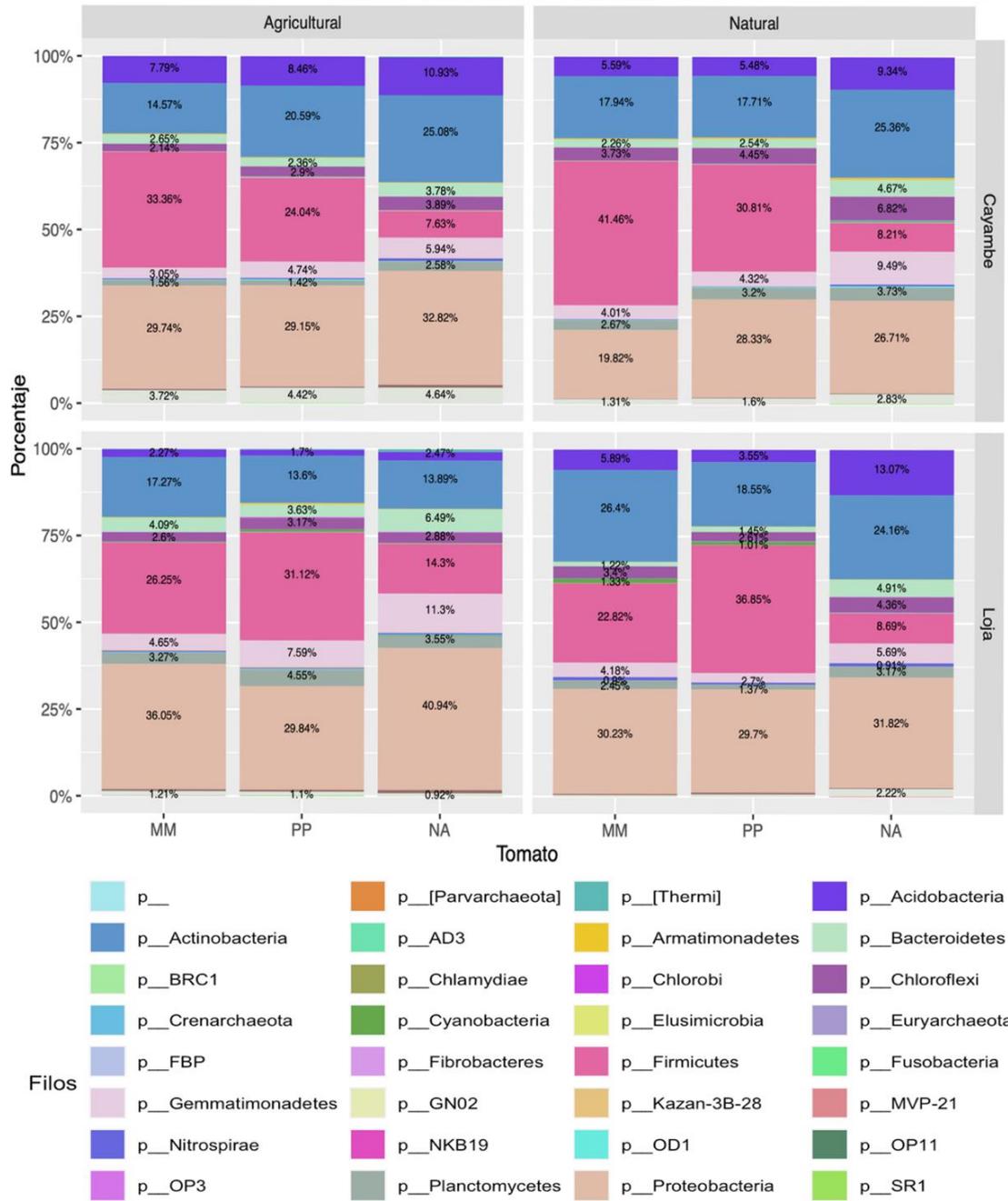


Figura 2. Porcentaje de filos hallados en suelos agrícolas y naturales de las ciudades de Loja y Cayambe.

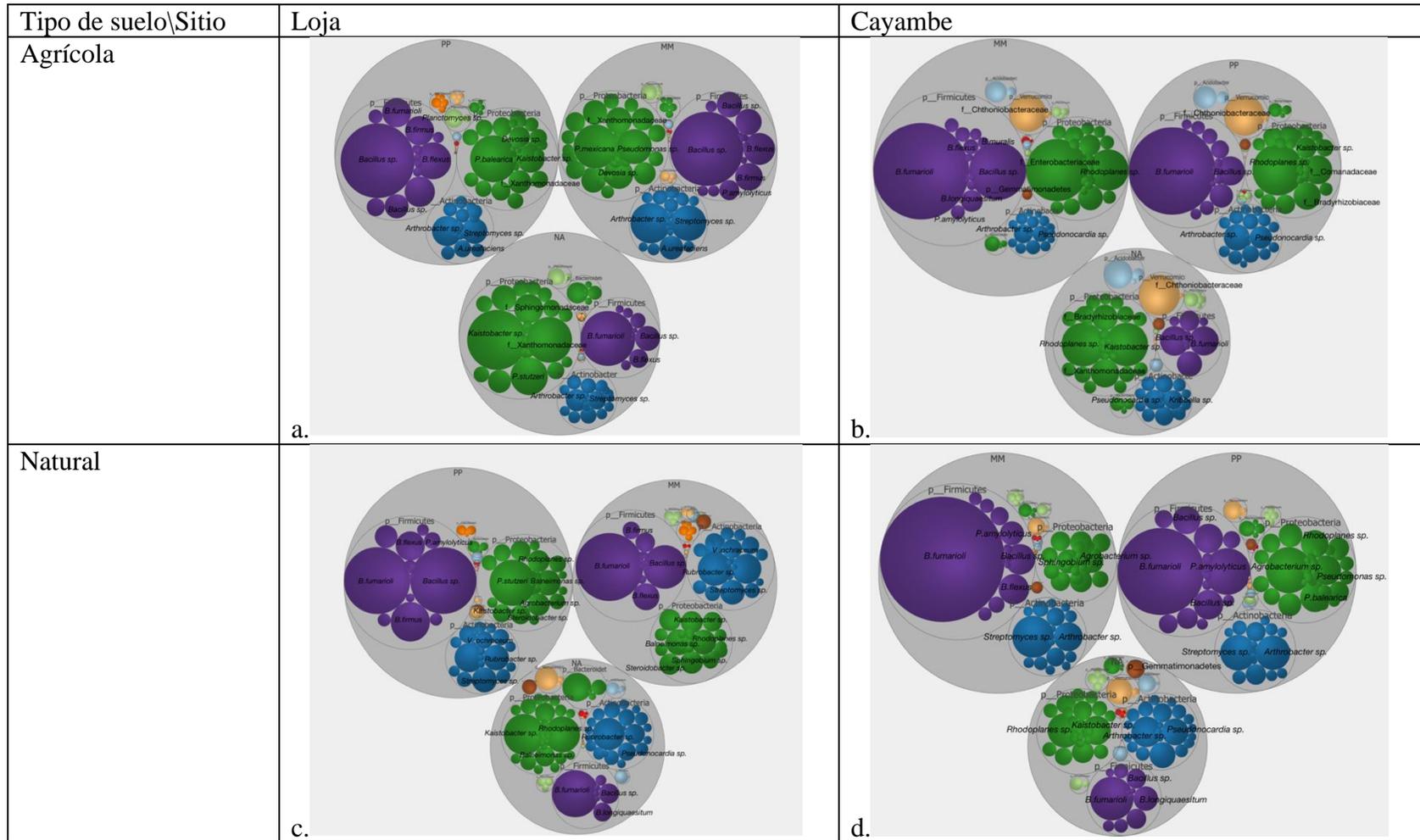


Figura 3. Microorganismos predominantes pertenecientes a los tratamientos “MM,” “PP,” y “NA” en suelos Agrícolas y Naturales de las ciudades de Cayambe y Loja. El tamaño de cada círculo representa la abundancia de cada taxón y el color diferencia los filos encontrados.

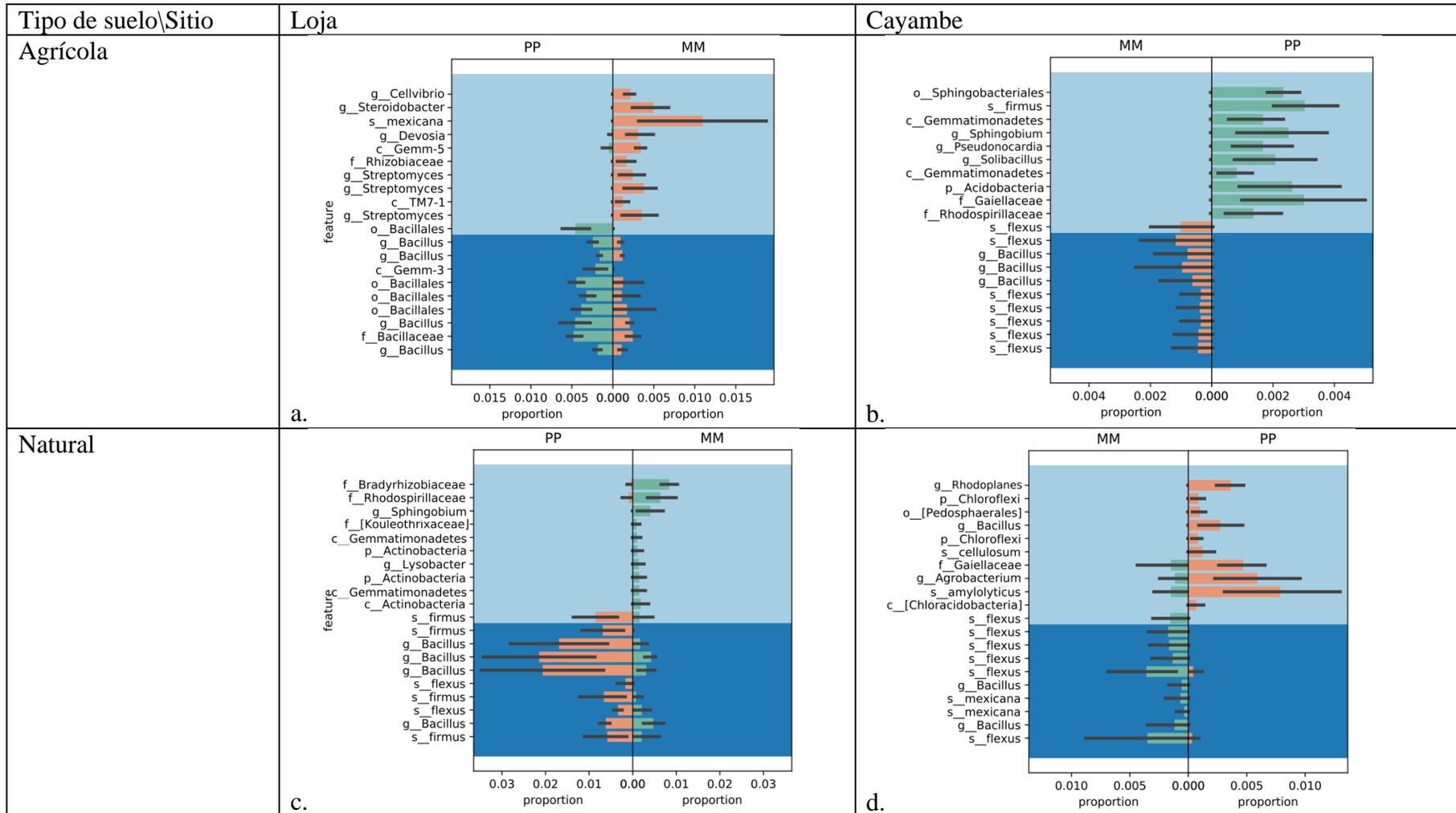


Figura 4. Gráficas de proporción donde se comparan especies presentes en los tratamientos “MM” y “PP” en suelos Agrícolas y Naturales de las ciudades de Cayambe y Loja.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

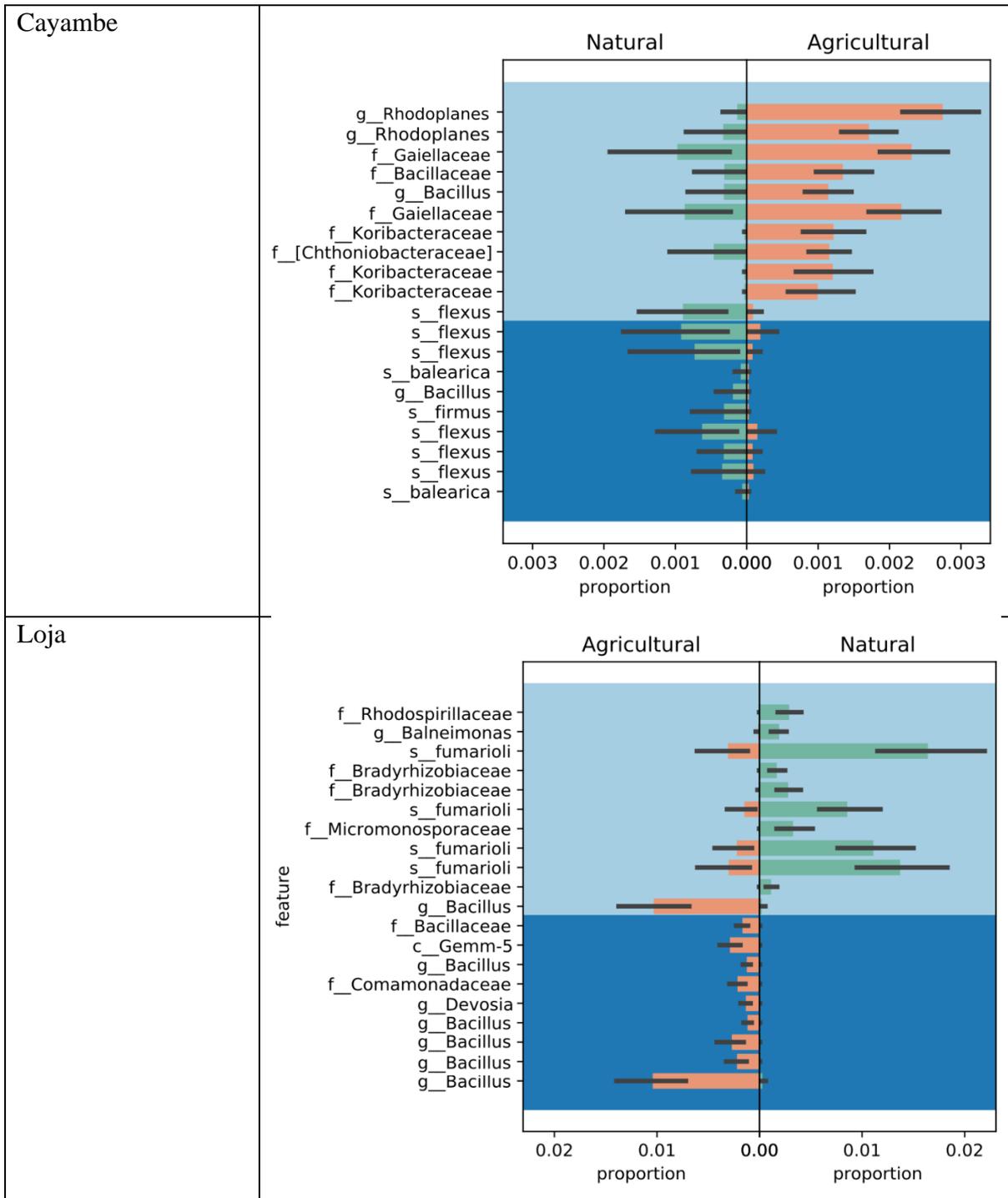
- Antoniou, A., Tsolakidou, M. D., Stringlis, I. A., & Pantelides, I. S. (2017). Rhizosphere microbiome recruited from a suppressive compost improves plant fitness and increases protection against vascular wilt pathogens of tomato. *Frontiers in plant science*, 8, 2022.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of botany*, 100(5), 1085-1094.
- Balach, D., Raja, P., Kumar, K., & Sundaram, S. P. (2007). Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2(2), 49-57.
- Bandyopadhyay, P., Bhuyan, S. K., Yadava, P. K., Varma, A., & Tuteja, N. (2017). Emergence of plant and rhizospheric microbiota as stable interactomes. *Protoplasma*, 254(2), 617-626.
- Biebl, H., & Pfennig, N. (1981). Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In *The prokaryotes* (pp. 267-273). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 5, 148.
- Bolyen, E., Rideout, J., Dillon, M., Bokulich, N., Abnet, C., ... & Caporaso, J. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852–857.

- 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 (Bachelor's thesis, Quito).
- Cheng, Z., Lei, S., Li, Y., Huang, W., Ma, R., Xiong, J., ... & Tian, B. (2020). Revealing the variation and stability of bacterial communities in tomato rhizosphere microbiota. *Microorganisms*, 8(2), 170.
- Cordero-Ramírez, J. D., López-Rivera, R., Calderón-Vázquez, C. L., Figueroa-López, A. M., Martínez-Álvarez, J. C., Leyva-Madrigal, K. Y., ... & Maldonado-Mendoza, I. E. (2012). Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(3), 712-730.
- Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2019). Ecology and evolution of plant microbiomes. *Annual review of microbiology*, 73, 69-88.
- Dong, C. J., Wang, L. L., Li, Q., & Shang, Q. M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS One*, 14(11), e0223847.
- Gkarmiri, K., Mahmood, S., Ekblad, A., Alström, S., Högberg, N., & Finlay, R. (2017). Identifying the active microbiome associated with roots and rhizosphere soil of oilseed rape. *Applied and environmental microbiology*, 83(22), e01938-17.
- Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Frontiers in microbiology*, 7, 1971.

- Kim, J. S., Dungan, R. S., Kwon, S. W., & Weon, H. Y. (2006). The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1267-1273.
- Klee, H. J., & Resende Jr, M. F. (2020). Plant domestication: Reconstructing the route to modern tomatoes. *Current Biology*, 30(8), R359-R361.
- López, L. (2017). Manual técnico del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. *Programa Regional de Investigación e Innovación por Cadenas de Valor Agrícola (UE/IICA)*. Recuperado el 18 de septiembre de 2021 de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Mariotte, P., Mehrabi, Z., Bezemer, T. M., De Deyn, G. B., Kulmatiski, A., Drigo, B., ... & Kardol, P. (2018). Plant–soil feedback: bridging natural and agricultural sciences. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(2), 129-142.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., & Meena, R. S. (Eds.). (2016). *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 1-20). New Delhi: Springer.
- Obando, E. (202). Exploration of beneficial microorganisms associated with seeds and roots of tomatoes in native soils of Ecuador (Bachelor's thesis, Quito).
- Raut, S., Polley, H. W., Fay, P. A., & Kang, S. (2018). Bacterial community response to a preindustrial-to-future CO₂ gradient is limited and soil specific in Texas Prairie grassland. *Global change biology*, 24(12), 5815-5827.

- Renuka, D. M., Sadashiva, A. T., Kavita, B. T., Vijendrakumar, R. C., & Hanumanthiah, M. R. (2014). Evaluation of cherry tomato lines (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) for growth, yield and quality traits. *Plant Archives*, *14*(1), 151-154.
- Rehman, R. Kinza W., Haq N., Muhammad A. *Medicinal plants of south Asia*, 631.
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, ecosystems & environment*, *140*(3-4), 339-353.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African journal of agricultural research*, *9*(16), 1265-1277.
- Souza, J. A. M., Alves, L. M. C., de Mello Varani, A., & de Macedo Lemos, E. G. (2014). The family bradyrhizobiaceae. *The Prokaryotes*, 135-154.
- Sun, W., Xiao, E., Krumins, V., Häggblom, M. M., Dong, Y., Pu, Z., ... & Li, F. (2018). Rhizosphere microbial response to multiple metal (loid) s in different contaminated arable soils indicates crop-specific metal-microbe interactions. *Applied and environmental microbiology*, *84*(24), e00701-18.
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature reviews microbiology*, *18*(11), 607-621.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, *14*(6), 1-10.

ANEXO 1: Gráficas de proporción dependiendo del sitio de análisis



ANEXO 2: Gráficas de proporción dependiendo del tipo de suelo analizado

