

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Exploración del microbioma asociado a las raíces de tomates en
las Islas Galápagos**

Emilia Fernanda Vásconez Vallejo

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 19 de mayo de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Exploración del microbioma asociado a las raíces de tomates en
las Islas Galápagos**

Emilia Fernanda Vásconez Vallejo

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van 't Hof, PhD.

Quito, 19 de mayo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Emilia Fernanda Vásconez Vallejo

Código: 00333748

Cédula de identidad: 1720026655

Lugar y fecha: Quito, 19 de mayo de 2023

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Los microbiomas son asociaciones de microorganismos, así como todos sus genes y sus interacciones, que se encuentran ocupando un hábitat específico. En estudios recientes se ha investigado las asociaciones de comunidades microbianas con organismos como las plantas; se conoce que este ensamblaje microbiano se da en la rizosfera y dichas asociaciones resultan esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En este sentido, el presente estudio tiene como objetivo estudiar la diversidad taxonómica de los microbiomas que establecen relaciones con tomates endémicos (*S. galapagense* y *S. cheesmaniae*) e introducidos (*S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*) que habitan las Islas Galápagos, adicionalmente, se busca determinar si la composición bacteriana encontrada en *S. pimpinellifolium* en el archipiélago es diferente a la población de *S. pimpinellifolium* que habita el continente. Para ello se realizó el secuenciamiento de las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr a partir del ADN extraído de muestras de rizosfera. Los resultados muestran que la abundancia relativa a nivel de clase difiere entre las especies introducidas y endémicas.; así mismo se evidenció que la riqueza de especies bacterianas es mayor en los tomates introducidos, en comparación con los endémicos. Por otro lado, al comparar el microbioma de la población de *S. pimpinellifolium* continental con la del archipiélago fue posible determinar que los individuos del archipiélago albergan una mayor riqueza de especies-. De esta manera, la presente investigación revela indicios sobre la composición taxonómica de los microbiomas asociados a la raíz de tomates en las Islas Galápagos.

Palabras clave: Microbioma, tomate, Galápagos, bacterias, rizosfera, 16S ARNr, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum galapagense*.

ABSTRACT

Microbiomes are associations of microorganisms, as well as all their genes and their interactions, that are found occupying a specific habitat. Recent studies have investigated the associations of microbial communities with organisms such as plants; It is known that this microbial assembly also occurs in the rhizosphere and that these associations are essential for the growth and development of plants. The present study aims to investigate the taxonomic diversity of microbiomes that establish relationships with the roots of the endemic tomatoes *S. galapagense* and *S. cheesmaniae*, and with the introduced tomatoes *S. lycopersicum* and *S. pimpinellifolium* that inhabit the Galapagos Islands; Furthermore, we investigate if the bacterial composition as found in *S. pimpinellifolium* in the archipelago is different from the bacterial composition of a population of *S. pimpinellifolium* from the continent. For this, we sequenced the 16S rRNA gene to characterize the bacteria of the tomato rhizosphere. The results show that the relative abundance at the bacterial class level differed between introduced and endemic species; On the one hand, our results suggest that the bacterial species richness is higher in introduced tomatoes, compared to the endemic species. On the other hand, by comparing the continental *S. pimpinellifolium* population with that of the archipelago, it was concluded that individuals of the archipelago harbor a greater richness of bacterial species in their microbiome. In this way, the present study reveals the first clues about the taxonomic composition of the microbiomes associated with tomato roots in the Galapagos Islands.

Key words: Microbiome, Galapagos, bacteria, tomato, rhizosphere, 16S rRNA, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum galapagense*.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
METODOLOGÍA	14
Área de Estudio y Método de Colección.....	14
Extracción de ADN rizosférico	14
Secuenciación del material genético y Análisis bioinformático	15
RESULTADOS.....	16
Análisis de Abundancia.....	16
Análisis de Diversidad	16
Análisis Comparativo.....	17
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	22
TABLAS	23
FIGURAS	24
REFERENCIAS.....	28
ANEXOS	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alfa diversidad según el índice de Chao.....	23
Tabla 2. Alfa diversidad según el índice de Chao población continental vs archipiélago	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa con coordenadas de recolección del sub-set de datos.....	24
Figura 2. Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase para cada especie de tomate	25
Figura 3. Diversidad alpha según el índice de Chao	25
Figura 4. Diversidad beta según el índice de Bray-Curtis	26
Figura 5 Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase para <i>S. pimpinellifolium</i> del continente vs <i>S. pimpinellifolium</i> del archipiélago.....	26
Figura 6. Diversidad alpha según el índice de Chao y diversidad beta según el índice de Bray-Curtis en Archipiélago vs Continente	27

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo separación de suelo rizosferico de la raíz	31
ANEXO 2: Pipeline QIIME 2 para procesamiento de secuencias.....	32
ANEXO 3: Fotografía de <i>S. galapagense</i> tomada en la salida de campo por la isla Isabela de las Islas Galápagos.....	35

INTRODUCCIÓN

Los microbiomas son asociaciones de microorganismos, así como todos sus genes y sus interacciones, que se encuentran ocupando un hábitat específico. En estudios recientes se ha investigado la relación entre estos consorcios microbianos y las especies vegetales; además se sugiere que dichas asociaciones son benéficas para el individuo ya que contribuyen a optimizar el desarrollo y crecimiento de la planta (Brugman et al., 2018). En cuanto a ensamblaje de microbiomas en la rizosfera se conoce que estos consorcios microbianos habitan la parte superficial o interna de la raíz y generan una asociación con la planta, en la cual esta brinda compuestos nutritivos que alimentan a la microbiota; mientras que estos producen metabolitos que benefician al crecimiento de la planta al suprimir la presencia de patógenos o producir compuestos que median el proceso de adquisición de nutrientes volviéndolo más efectivo (Tracanna et al., 2021).

Los microbiomas son consorcios que resultan esenciales para el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales; esto se debe a que se ha investigado su función como agentes que brinda resistencia a las plantas contra amenazas bióticas como los patógenos y también brindan tolerancia ante el estrés abiótico (Kwak et al., 2018). En este sentido, conocer cual es la composición taxonómica de la asociación microbiana presente en las raíces de los cultivos de tomate de las Islas Galápagos es de gran importancia para determinar su funcionalidad y si estas especies microbianas tienen un rol en aumentar la resistencia de los cultivos a estrés ambiental (Peixoto et al., 2022). Esto con el fin de examinar si los microbiomas son una alternativa para aumentar la resiliencia de las especies silvestres y así contribuir con la conservación de biodiversidad de los ecosistemas.

El tomate es una planta comestible de la familia *Solanácea* que se encuentra tanto en Ecuador continental como en las Islas Galápagos, siendo una especie de interés debido a su

alta demanda comercial a nivel mundial (Gerszberg et al., 2015). Al igual que otros cultivos de importancia, el tomate es susceptible a plagas como *Fusarium oxysporum* el cual es una especie de hongo patógeno que provoca el marchitamiento vascular en las plantas ocasionando su muerte (Gayosso et al., 2021).

En las Islas Galápagos se ha reportado la presencia de cuatro especies de tomate. Entre ellas está *Solanum cheesmaniae*, variedad endémica de las Islas comúnmente llamada tomatillo, con producción de frutos anaranjados o amarillentos y hojas carnosas de tamaño pequeño (Valencia, 2021). *Solanum galapagense* es la segunda especie endémica de Galápagos, esta presenta características similares a *S. cheesmaniae* pero su diferencia radica en que sus frutos son de menor tamaño y de color naranja, además de que presenta un follaje más tupido (Pailles et al., 2017).

También se encuentra *Solanum pimpinellifolium* especie nativa del Ecuador continental, no obstante, actualmente también se la encuentra en las Isla Galápagos y se especula que esta especie colonizó las islas a partir de la costa ecuatoriana ya que en esta área se han encontrado especímenes genéticamente similares (Zuriaga et al., 2009). Finalmente, *Solanum lycopersicum*, variedad domestica comúnmente denominada tomate riñón, que es cultivada y produce frutos grandes de color rojo (Campoverde, 2019).

Por otro lado, es relevante recalcar que las Islas Galápagos son de origen volcánico ya que fueron formadas por el ascenso de magma hasta la superficie a través de fracturas en la placa tectónica de Nazca (Espinosa et al., 2022). En este sentido, los suelos de las islas se componen principalmente de roca desnuda, en la zona árida que va de los 0 a 120 msnm en el suelo se puede hallar una capa de litosoles (Balón & Vera, 2018); por otro lado, en la zona agrícola que se encuentra hasta los 450 msnm el suelo es limoso y presenta mayor espesor contextura arcillosa, lo cual lo vuelve un tipo de tierra fértil fácil de trabajar. Finalmente, a una altitud mayor el suelo de las islas disminuye su espesor y se vuelve menos adecuado para

trabajos agrícolas (Balón & Vera, 2018). Cabe mencionar que el suelo de cada isla presenta una edad distinta dado que las islas se formaron en distinto tiempo, siendo San Cristóbal una isla antigua que se formó hace 4 millones de años; comparada con la isla Isabela se formó hace 700.000 años aproximadamente (Geist, 1997).

Varios estudios se han llevado a cabo sobre microbiomas asociados a tomate en Ecuador continental, como por ejemplo aquel llevado a cabo por Molina en el año 2021 en el cual se comparó el microbioma de las raíces de tomate nativo y moderno en la Sierra ecuatoriana (Molina, 2021). Estudios se han limitado únicamente a analizar individuos de Ecuador continental, razón por la cual aún no se conoce cuales son los microorganismos asociados a la raíz de tomates que habitan el archipiélago de Galápagos. En este sentido, debido a la escasa información existente sobre este grupo, en la presente investigación la pregunta que se plantea es ¿cuál es la composición de las comunidades bacterianas presentes alrededor de la raíz de tomate en las Islas Galápagos?

Con estos antecedentes, el presente estudio tiene como objetivo conocer la composición de las comunidades bacterianas presentes en la raíz de las cuatro especies de tomate presentes en las Islas Galápagos. Específicamente, este estudio busca investigar la diversidad taxonómica de los microbiomas asociados con los tomates endémicos e introducidos que habitan el archipiélago. Así mismo, se busca determinar las diferencias entre la composición bacteriana de la rizósfera de *S. pimpinellifolium* en el archipiélago y la de *S. pimpinellifolium* que habita el continente. De esta manera, la presente investigación se fundamenta en realizar el secuenciamiento de las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr a partir del ADN total extraído de muestras de rizósfera pertenecientes a tomates que habitan las Islas Galápagos.

METODOLOGÍA

Área de Estudio y Método de Colección

El presente estudio se llevo acabo en el Archipiélago de Galápagos, en dónde el muestreo se realizó en las 4 islas (Isabela, Santa Cruz, San Cristóbal y Floreana). Se recolectó un total de 59 muestras pertenecientes a las siguientes especies: 14 muestras de *Solanum galapagense*; 10 muestras de *Solanum cheesmaniae*; 15 muestras de *Solanum pimpinellifolium* y 20 muestras de *Solanum lycopersicum*. De la totalidad, se tomó una sub-muestra aleatoria de tres especímenes de cada una de las 4 especies de tomate. En la **Figura 1** se evidencian las coordenadas de recolección de las 12 muestras.

Durante la recolección de las muestras, se identificaron los individuos por sus características morfológicas (forma, tamaño y color de hoja y frutos) y se tomaron las coordenadas del sitio de recolección. Una vez seleccionada la planta, se excavó alrededor del individuo hasta visualizar las raíces secundarias. Se realizó un corte de tres centímetros de raíz, la cual se colocó dentro de un tubo falcón de 5 ml con *LifeGuard Soil Preservation* (Qiagen USA). Posteriormente el material fue almacenado a -4°C hasta su movilización a los laboratorios en donde se almacenó a -20°C con el fin de preservar el material genético (Chanco, 2020).

Extracción de ADN rizosférico

Para la extracción de ADN total, se realizó la separación del suelo rizosferico de la raíz; para ello se realizó una separación mecánica a través de centrifugación y agitación siguiendo el protocolo adaptado por Astudillo (2022, no publicado) detallado en el **Anexo 1**. El ADN total de las 12 muestras de suelo rizosférico se extrajo por lisis mecánica siguiendo el método

de purificación por columnas presente en el protocolo del fabricante del kit *DNeasy PowerSoil*® (Qiagen, USA).

Secuenciación del material genético y análisis bioinformático

La caracterización metataxonómica bacteriana se realizó mediante la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S de ARN ribosomal (Chanco, 2020). Las muestras de ADN total fueron enviadas a secuenciar en la plataforma Illumina MiSeq por la empresa BioSequence (Quito-Ecuador). Se obtuvieron 2 archivos FASTQ (*forward* y *reverse*) por cada una de las muestras obteniendo un total de 24 archivos.

Las secuencias fueron procesadas mediante la herramienta bioinformática QIIME 2, en el cual se aplicó un proceso de demultiplexar y posteriormente se aplicó un *denoising* siguiendo el pipeline DADA2, con el fin de eliminar las secuencias que presentaban baja calidad; de esta manera se aplicaron valores límites de la secuencia forward de 20 a 230 bases y de la secuencia reverse igualmente de 20 a 230 bases. Las secuencias de dos muestras de *Solanum lycopersicum* no pasaron el control debido a su baja calidad y por tanto no fueron utilizadas para los análisis posteriores.

Siguiendo el pipeline en QIIME 2 que se encuentra en el **Anexo 2**, se realizó el procesamiento de las 10 muestras con secuencias que pasaron el control de calidad y se obtuvo como producto final un archivo en formato BIOM. Este archivo fue cargado en la plataforma Microbiome Analyst (2.0) (<https://www.microbiomeanalyst.ca>) para realizar el análisis estadístico y visual de los datos del microbioma. De esta manera mediante la plataforma se obtuvieron índices de alfa y beta diversidad, y gráficos de abundancia relativa para cada una de las cuatro especies de tomate de las Islas Galapagos.

RESULTADOS

Análisis de Abundancia

Se determinó la abundancia relativa de bacterias presentes en el microbioma de cada especie de tomate, los resultados se muestran en la **Figura 2**. El gráfico de barras muestra la abundancia relativa de las bacterias a nivel taxonómico de clase según cada una de las cuatro especies de tomate. Para las cuatro especies (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*), las tres clases de bacterias con mayor abundancia son Alphaproteobacteria, Bacili y Actinobacteria. Se observa que la distribución de abundancia de las clases de bacterias es similar entre los dos tomates introducidos *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*, mientras que, para las especies endémicas, la distribución de abundancia difiere. Por un lado, para *S. galapagense* la clase con mayor abundancia es Alphaproteobacteria con el 52,36% de la abundancia; adicionalmente, en la rizosfera de esta especie se evidenció mayor presencia de la clase Rubrobacteria con el 5,36%, en comparación con las otras especies de tomate en las cuales su abundancia no representa ni el 1%. Por otro lado, para *S. cheesmaniae* la clase con mayor abundancia es Bacili, que representa el 45,92%.

Análisis de Diversidad

Para el análisis de diversidad alfa a nivel taxonómico de género se utilizó el índice de Chao 1 y como método estadístico el test Anova, los resultados de diversidad se muestran en un diagrama Boxplot en la **Figura 3**. La riqueza de especies para *S. lycopersicum* es mayor en comparación con la riqueza de especies para *S. galapagense*. Los valores de diversidad según el índice de Chao 1 para cada una de las 10 muestras analizadas se muestran en la **Tabla 1**. Adicionalmente, los valores estadísticos (valor $F=8,8121$; valor $p=0,0128$) sugieren que si existen diferencias significativas entre la diversidad de las cuatro especies de tomate. En cuanto a diversidad beta a nivel taxonómico de género, se determinó por medio del método estadístico

PERMANOVA y se utilizó el índice de Bray-Curtis, mediante el cual se busca determinar si las distancias dentro de un grupo, es decir, una misma especie son significativamente similares (o diferentes) entre sí, al compararlas con las distancias de los datos de otro grupo, es decir, de las otras especies. Los resultados de diversidad beta se muestran en un diagrama Emperor plot en la **Figura 4**, en el cual no se observan agrupaciones (*clustering*) definidas por especie de tomate. Adicionalmente, los valores estadísticos (valor $F=0,2403$; valor $p=0,936$) sugieren que no existen diferencias significativas entre la diversidad bacteriana de los tomates.

Análisis Comparativo

Para determinar si la composición bacteriana encontrada en *S. pimpinellifolium* presente en el archipiélago es diferente a la de *S. pimpinellifolium* del continente, se realizó un análisis de abundancia relativa y de alfa y beta diversidad. Los archivos de las secuencias de cuatro muestras de *S. pimpinellifolium* continental utilizadas para el análisis fueron proporcionadas por Stalin Sarango-Flores del Instituto Holandés de Ecología (NIOO-KNAW), de muestras tomadas durante su salida de campo de una población ubicada en Zapotillo, provincia de Loja en Ecuador, utilizando la misma metodología descrita anteriormente para las muestras de las Islas Galápagos. En la **Figura 5** se evidencia que la abundancia relativa de las bacterias a nivel de clase para la población de *S. pimpinellifolium* del archipiélago, en comparación con la población del continente. En el gráfico se visualiza que para la población del continente hay una presencia dominante de Gammaproteobacteria, que representa el 88,07% de la abundancia bacteriana. Por otro lado, la población del archipiélago evidencia comunidades bacterianas con una composición con mayor riqueza y diversidad de clases bacterianas en donde no se observa que una única clase bacteriana predomine sobre el resto. Adicionalmente las clases bacterianas con mayor presencia son Alphaproteobacteria, Bacili y Actinobacteria que representa el 28,63%, 24,55%, y 26,19% de la abundancia respectivamente.

Para el análisis de diversidad alfa a nivel taxonómico de género se utilizó el índice de Chao 1 y como método estadístico la prueba t, los resultados de diversidad se muestran en un diagrama Boxplot en la **Figura 6**. La riqueza de especies para *S. pimpinellifolium* del archipiélago es mayor en comparación con la población del continente. Los valores de diversidad según el índice de Chao 1 para cada una de las muestras analizadas se muestran en la **Tabla 2**. Adicionalmente, los valores estadísticos (valor $t=3,614$; valor $p=0,0177$) sugieren que si existen diferencias significativas entre la diversidad de las dos poblaciones de *S. pimpinellifolium*.

Finalmente, en cuanto a diversidad beta a nivel taxonómico de género, se utilizó el método estadístico PERMANOVA y se aplicó el índice de Bray-Curtis, mediante el cual se busca determinar si las distancias dentro de un grupo, es decir, una población, son estadísticamente similares entre sí, al compararlas con las distancias de los datos de la otra población de tomate. Los resultados de diversidad beta se muestran en un diagrama Emperor plot en la **Figura 6**. En el diagrama se evidencia una asociación clara, dado que la población del continente se agrupa (formando un clúster). Adicionalmente, los valores estadísticos (valor $F=11,817$; valor $p=0,038$) sugieren que existen diferencias significativas entre los grupos.

DISCUSIÓN

Al analizar la abundancia relativa de las distintas clases de bacterias (**Figura 2**) se evidenció que la composición bacteriana del microbioma de las especies endémicas difiere al de las dos especies introducidas. Para *S. galapagense* la clase con mayor abundancia es Alphaproteobacteria con el 52,36% de la abundancia; esta clase de bacterias se caracterizan por albergar la mayor parte de especies de rizobios, que son microorganismos capaces de fijar nitrógeno en el suelo (Díaz et al., 2018). Esto era de esperarse ya que *S. galapagense* crece mayoritariamente de 0 a 120 msnm en donde los suelos de las Galápagos son áridos con textura rocosa (Balón & Vera, 2018). Razón por la cual esta especie necesita de asociaciones que faciliten la obtención de nutrientes como el nitrógeno. Por otro lado, para *S. cheesmaniae* la clase con mayor abundancia es Bacili, que representa el 45,92%. Dentro de esta clase se encuentra el género *Bacillus* caracterizado por producir proteínas y metabolitos eficientes para el control de plagas, adicionalmente también promueven el crecimiento vegetal a través de la solubilización del fósforo (Corrales et al., 2017). Teniendo en cuenta que *S. cheesmaniae* crece tanto en suelos áridos como en la zona agrícola, esta especie necesita de asociaciones que le permitan resistir el estrés abiótico presente en los suelos de cultivo, así como microorganismos que aumenten la disponibilidad de fósforo en los suelos áridos.

Al analizar la diversidad alfa (**Figura 3**) los valores estadísticos muestran que sí existen diferencias significativas entre la diversidad hallada entre las cuatro especies de tomate. En sí se evidencia que existe una menor riqueza de especies bacterianas en el microbioma de los tomates endémicos, en comparación con la especie comercial e introducida *S. lycopersicum* que presenta una mayor riqueza. Esto puede darse debido a que se ha sugerido que las plantas no nativas al ocupar un nuevo suelo dan lugar a procesos de retroalimentación positiva con los microorganismos inherentes de la zona (Rodríguez, 2009). Esto podría explicar la razón de que

exista un mayor número de especies bacterianas asociadas a la rizosfera de especies de tomate introducido. Por otro lado, en cuanto a la diversidad beta (**Figura 4**) el diagrama Emperor plot muestra que no hay patrones de agrupamiento definidos por especie de tomate, además los valores estadísticos evidencian que no existen diferencias significativas entre los grupos, lo que quiere decir que la composición de especies bacterianas del microbioma es similar para *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*.

En cuanto al análisis comparativo, al analizar la abundancia relativa de las distintas clases de bacterias para la población de *S. pimpinellifolium* del archipiélago, en comparación con la población del continente (**Figura 5**). Se evidencia que en la población continental la clase Gammaproteobacteria predomina sobre el resto ya que representa el 88,07% de la abundancia bacteriana; esta clase de bacterias se caracterizan por albergar especies que promueven el crecimiento vegetal al producir fitohormonas que fomentan el crecimiento de raíces (Sánchez & Guerra, 2022). Estos resultados son similares a otros reportados en la literatura en donde igualmente se reportó la presencia del orden Xanthomonadales (clase Gamaproteobacteria) en la rizosfera de *S. pimpinellifolium* cultivado en suelo nativo de Ecuador continental (Gallardo, 2021); lo que sugiere que existen comunidades bacterianas estables asociadas a la rizosfera de esta especie.

Por otro lado, al analizar la diversidad alfa (**Figura 6**) los valores estadísticos muestran que si existen diferencias significativas entre la diversidad hallada para la población de *S. pimpinellifolium* continental y la de las Islas Galápagos. En sí se evidencia que existe una menor riqueza de especies bacterianas en el microbioma de los tomates del continente, en comparación con la población del archipiélago que presenta una mayor riqueza. Esto puede darse debido a que *S. pimpinellifolium* es una especie introducida en las islas y por tanto al colonizar un nuevo suelo debe buscar formar asociaciones con distintos tipos de microorganismos como mecanismo adaptativo, y como ya se mencionó antes, las plantas no

nativas promueven la retroalimentación positiva con los microorganismos del suelo (Rodríguez, 2009). Esto explica porque la población de las islas presenta una mayor riqueza de especies bacteriana. Con respecto a la diversidad beta, (**Figura 6**) el diagrama Emperor plot muestra una asociación clara en dónde los individuos pertenecientes al continente forman una agrupación definida. Además, los valores estadísticos evidencian que, sí existen diferencias significativas entre ambos grupos, lo que quiere decir que la composición de especies bacterianas del microbioma de la población de *S. pimpinellifolium* del continente es diferente al de la población de Galápagos.

Finalmente, dado que este estudio es uno de los pioneros en explorar el microbioma asociado a las raíces de los tomates de las Islas Galápagos; se trabajó con una submuestra de 12 muestras elegidas aleatoriamente del total de 59 muestras tomadas de las Islas. En este sentido, el control de calidad de las secuencias reveló que dos de las muestras no cumplían con los estándares de calidad de secuenciamiento necesario por lo cual únicamente se trabajó con 10 muestras. Por este motivo se recomienda que en estudios posteriores se utilice un mayor número de muestras con el fin de mejorar el poder estadístico de los resultados. Así mismo, como perspectiva a futuro se sugiere realizar la exploración del microbioma asociado a la filosfera ya que estudios recientes sugieren que este tejido vegetal alberga una gran diversidad de comunidades microbianas, pero sigue poco estudiado (Barrera et al., 2019).

CONCLUSIONES

En base al secuenciamiento del gen 16S ARNr a partir del ADN extraído de la rizosfera de tomates que habitan las Islas Galápagos, se determinó que la abundancia relativa de clases bacterianas difiere entre las especies introducidas y endémicas. Los resultados del estudio sugieren que la riqueza de especies bacterianas es mayor en las especies de tomates introducidos, en comparación con los tomates endémicos. Por otro lado, al comparar la población de continental con la del archipiélago fue posible determinar que los individuos de *S. pimpinellifolium* de las Islas Galápagos albergan una mayor riqueza de especies en su microbioma, además, la composición del mismo difiere significativamente del microbioma de la población continental.

Finalmente, teniendo en cuenta que el tomate es una planta comestible de alto interés comercial, es de gran relevancia explorar el microbioma asociado al mismo dado que los microbiomas son consorcios que resultan esenciales para el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales al ser agentes que brinda resistencia contra amenazas bióticas y ante el estrés abiótico. De esta manera la presente investigación nos arroja resultados sugerentes sobre la composición taxonómica de los microbiomas asociados a la raíz de tomates en las Islas Galápagos. No obstante, se debe tener en cuenta que en este estudio se analizó un total de 10 muestras, razón por la cual para futuras investigaciones se recomienda utilizar un tamaño de muestra mayor.

TABLAS

Tabla 1. Alfa diversidad según el índice de Chao para las 4 especies de tomate que habitan las islas Galapagos

Especie	Isla	Indice Chao1	se
<i>S. cheesmaniae</i>	Santa Cruz	29	0
<i>S. lycopersicum</i>	San Cristobal	39	0
<i>S. galapagense</i>	Floreana	17	0
<i>S. pimpinellifolium</i>	San Cristobal	35	2,58
<i>S. cheesmaniae</i>	Santa Cruz	27	0,08
<i>S. galapagense</i>	Isabela	19	0
<i>S. pimpinellifolium</i>	San Cristobal	35	0,06
<i>S. cheesmaniae</i>	Santa Cruz	26	0,08
<i>S. galapagense</i>	Isabela	26	0
<i>S. pimpinellifolium</i>	Santa Cruz	28,25	0,73

Tabla 2. Alfa diversidad según el índice de Chao para la población continental vs archipiélago de *S. pimpinellifolium*

Especie	Provincia	Indice Chao1	se
<i>S. pimpinellifolium</i>	Galápagos	97	0
<i>S. pimpinellifolium</i>	Galápagos	84	0,50
<i>S. pimpinellifolium</i>	Galápagos	70	0
<i>S. pimpinellifolium</i>	Loja	46,2	4,34
<i>S. pimpinellifolium</i>	Loja	37,5	1,03
<i>S. pimpinellifolium</i>	Loja	65	0
<i>S. pimpinellifolium</i>	Loja	34	0,10

FIGURAS

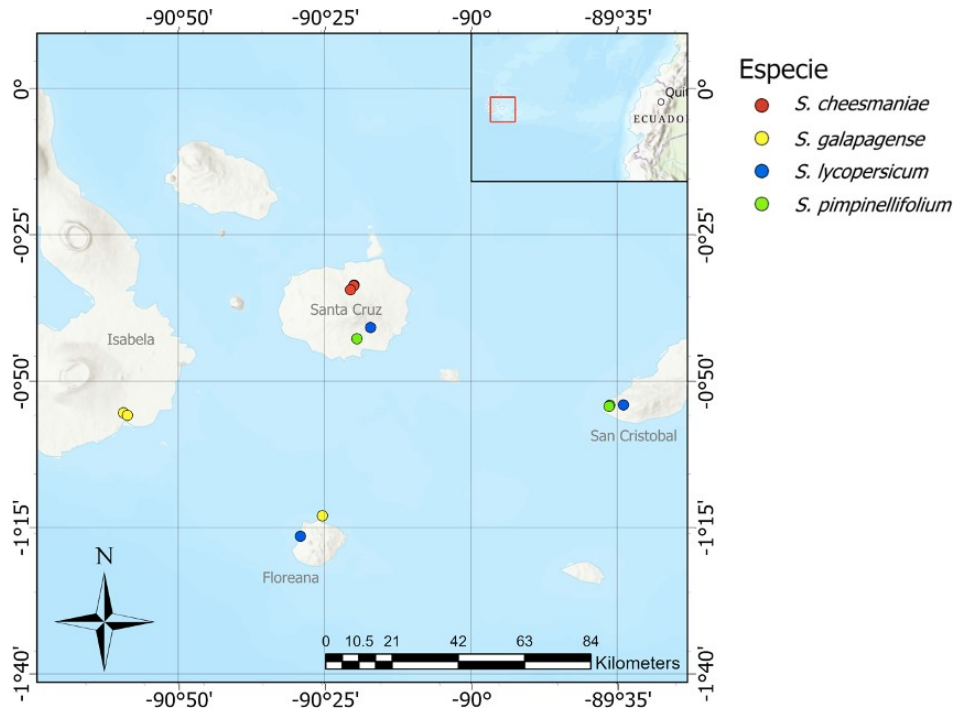


Figura 1. Mapa con coordenadas de recolección de la submuestra de tomates en las islas Galapagos

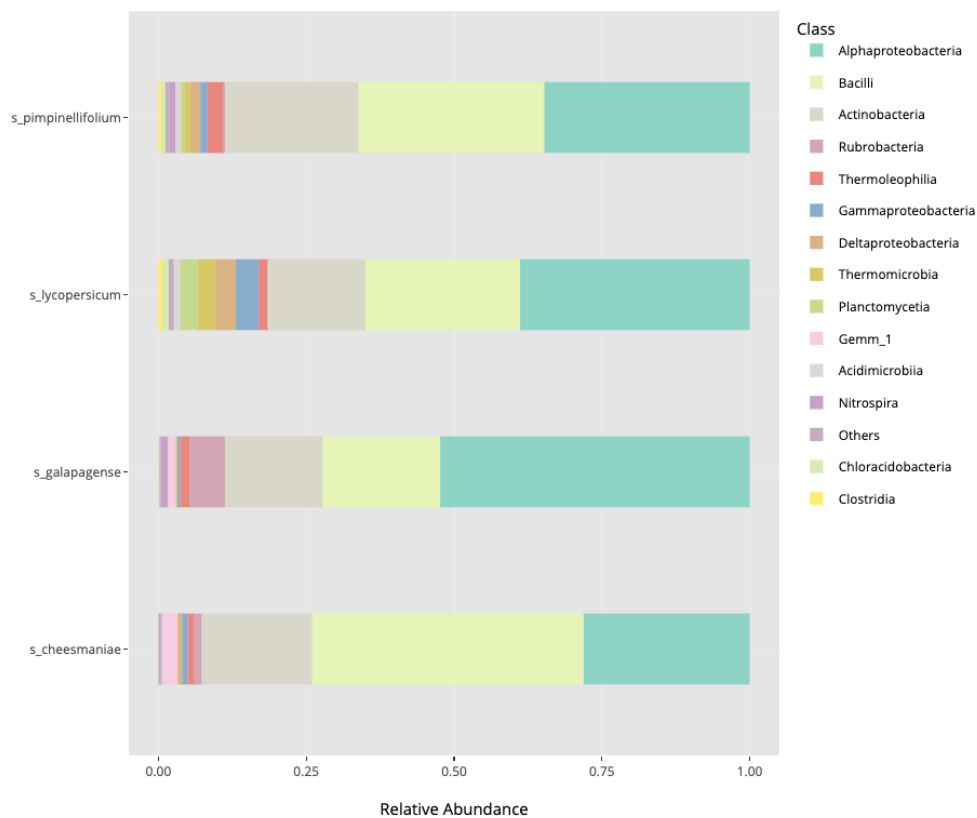


Figura 2. Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase para cada especie de tomate recolectada en las islas Galapagos

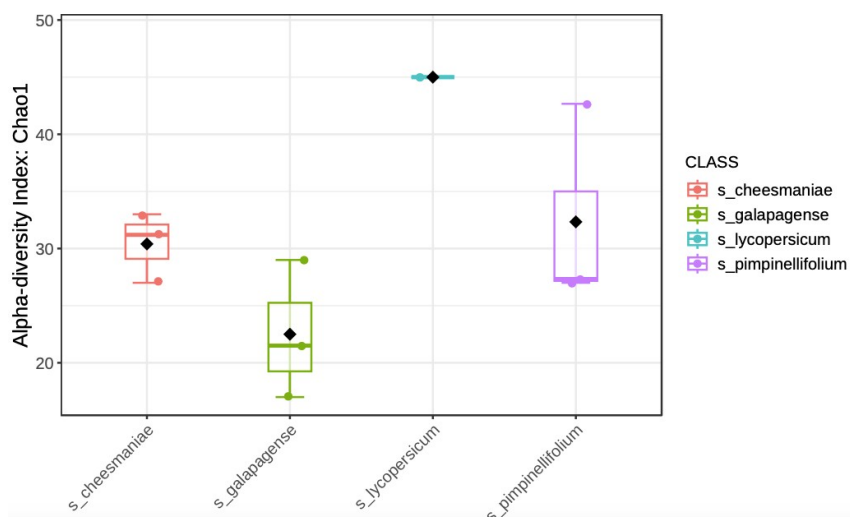


Figura 3. Diversidad alpha según el índice de Chao para cada especie de tomate recolectada en las islas Galapagos. Se muestra la diversidad alfa para *S. cheesmaniae*, representado en color rojo; *S. galapagense*, representado en color verde; *S. lycopersicum*, representado en color cian, y *S. pimpinellifolium* representado en color púrpura.

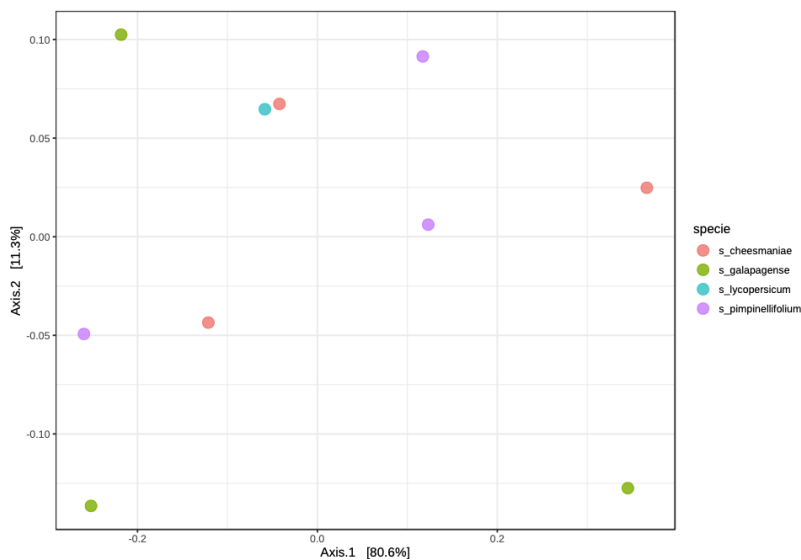


Figura 4. Diversidad beta según el índice de Bray-Curtis

Se muestra la diversidad alfa para *S. cheesmaniae*, representado en color rojo; *S. galapagense*, representado en color verde; *S. lycopersicum*, representado en color cian y *S. pimpinellifolium* representado en color púrpura.

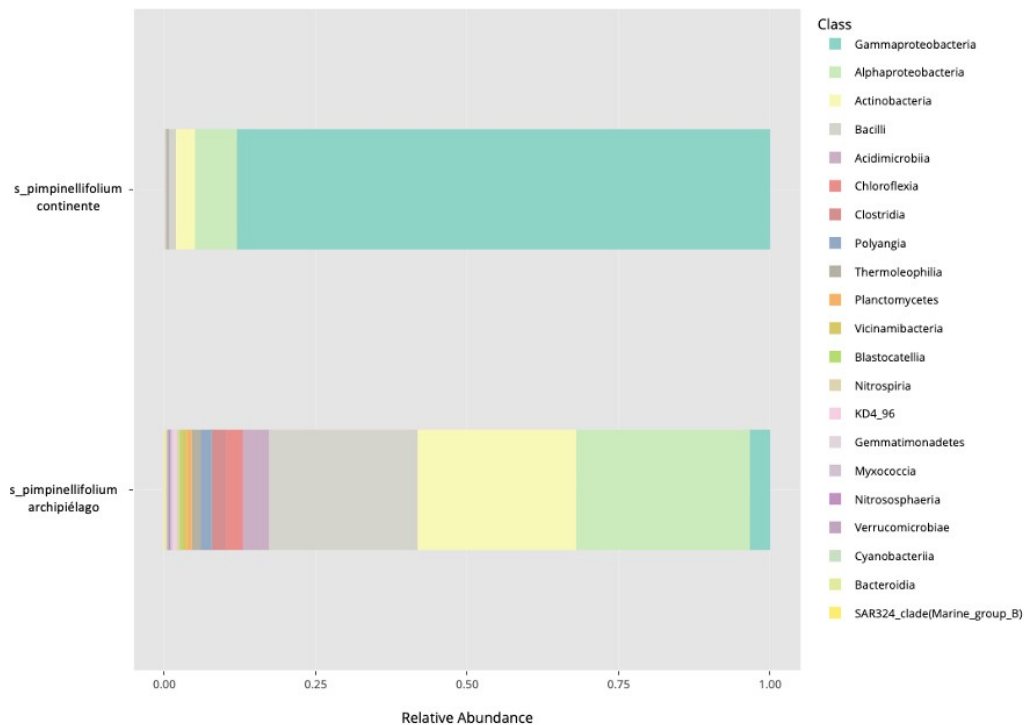


Figura 5 Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase para *S. pimpinellifolium* del continente vs *S. pimpinellifolium* del archipiélago.

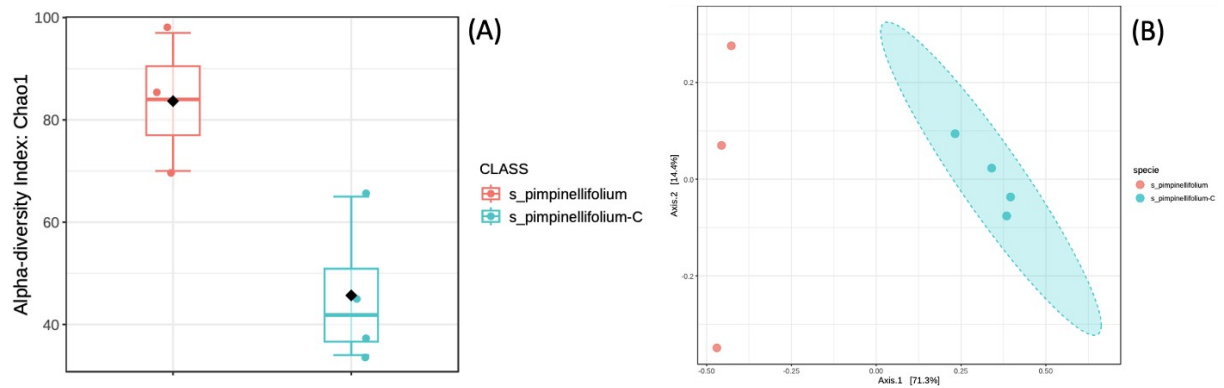


Figura 6. Diversidad alpha según el índice de Chao y diversidad beta según el índice de Bray-Curtis en Archipiélago vs Continente. Se muestra la diversidad alfa (A) y beta (B) para la población de *S. pimpinellifolium* del archipiélago, representado en color rojo vs la diversidad para *S. pimpinellifolium* del continente representado en color cian.

REFERENCIAS

- Balón, K., & Vera, E. (2018). Análisis de fertilidad de los suelos agrícolas de las Islas Galápagos-Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana. *UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR*.
- Barrera, S. E., Sarango-Flóres, S.-W., & Montenegro-Gómez, S.-P. (2019). The phyllosphere microbiome and its potential application in horticultural crops. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 13(3), 384-396.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13i3.8405>
- Brugman, S., Ikeda-Ohtsubo, W., Braber, S., Folkerts, G., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2018). A Comparative Review on Microbiota Manipulation: Lessons From Fish, Plants, Livestock, and Human Research. *Frontiers in Nutrition*, 5, 80.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00080>
- Campoverde, A. (2019). *PLAN DE NEGOCIOS PARA LA PRODUCCION Y DISTRIBUCIÓN DE PASTA DE TOMATE VARIEDAD SAN MARZANO EN LA PROVINCIA DE GALAPAGOS*. Universidad Tecnológica Indoamérica.
- Corrales Ramírez MSc, L. C., Caycedo Lozano MSc, L., Gómez Méndez, M. A., Ramos Rojas, S. J., & Rodríguez Torres, J. N. (2017). Bacillus spp: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45.
<https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- Díaz, S., Molina, D. C. M., & Tapias, D. F. R. (2018). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Filogenia, microbioma, y perspectivas*.
- Espinosa, J., Moreno, J., & Bernal, G. (2022). Suelos del Ecuador Clasificación, Uso y Manejo. *Instituto Geográfico Militar*.
- Gallardo, M. de J. (2021). *La vida al servicio de la vida: Bacterias asociadas con la rizósfera del tomate en el centro de su origen*. Universidad San Francisco de Quito.
- Gayosso, O., Chávez-Aguilar, G., López-Benítez, A., Marroquín-Morales, J. Á., López-Aguilar, K., & Hidalgo-Ramos, D. M. (2021). Evaluación de la respuesta de diferentes genotipos de tomate a Fusarium oxysporum raza 3. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(3), 409-420. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2284>
- Geist, D. (1997). *Sobre el surgimiento y hundimiento de las Islas Galapagos*.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and*

- Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Kwak, M.-J., Kong, H. G., Choi, K., Kwon, S.-K., Song, J. Y., Lee, J., Lee, P. A., Choi, S. Y., Seo, M., Lee, H. J., Jung, E. J., Park, H., Roy, N., Kim, H., Lee, M. M., Rubin, E. M., Lee, S.-W., & Kim, J. F. (2018). Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology*, 36(11), 1100-1109. <https://doi.org/10.1038/nbt.4232>
- Molina, A. (2021). Explorando un increíble mundo filamentoso: Estudio comparativo del micobioma. *Universidad San Francisco de Quito*.
- Pailles, Y., Ho, S., Pires, I., Tester, M., Negrao, S., & Schmockel, S. (2017). Genetic Diversity and Population Structure of Two Tomato Species from the Galapagos Islands. *Frontiers in Plant Science*, 8:138. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00138>
- Peixoto, R. S., Voolstra, C. R., Sweet, M., Duarte, C. M., Carvalho, S., Villela, H., Lunshof, J. E., Gram, L., Woodhams, D. C., Walter, J., Roik, A., Hentschel, U., Thurber, R. V., Daisley, B., Ushijima, B., Daffonchio, D., Costa, R., Keller-Costa, T., Bowman, J. S., ... Berg, G. (2022). Harnessing the microbiome to prevent global biodiversity loss. *Nature Microbiology*, 7(11), 1726-1735. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01173-1>
- Rodríguez, S. (2009). *Organismos del suelo: La dimensión invisible de las invasiones por plantas no nativas*. 32-43.
- Sánchez Carrillo, R., & Guerra Ramírez, P. (2022). Pseudomonas spp. Benéficas en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(4), 715-725. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2799>
- Tracanna, V., Ossowicki, A., Petrus, M. L. C., Overduin, S., Terlouw, B. R., Lund, G., Robinson, S. L., Warris, S., Schijlen, E. G. W. M., van Wezel, G. P., Raaijmakers, J. M., Garbeva, P., & Medema, M. H. (2021). Dissecting Disease-Suppressive Rhizosphere Microbiomes by Functional Amplicon Sequencing and 10× Metagenomics. *MSystems*, 6(3), e01116-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01116-20>
- Valencia, F. (2021). *TEMA Desarrollo de una barra de chocolate corriente endulzada a base de tomatillo de Galápagos (Solanum cheesmaniae)*. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL.
- Zuriaga, E., Blanca, J. M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W. G., Morales, R., & Nuez, F. (2009). Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*.

Genetic Resources and Crop Evolution, 56(1), 39-51. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9340-z>

ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo separación de suelo rizosferico de la raíz

- 1) Agitar cada tubo delicadamente y dejar que repose 5 minutos en posición vertical.
- 2) Sacar la raíz con suelo adherido con una pinza metálica estéril (flameada) y colocarla en un tubo falcon de 15 ml con 10 ml de solución PBS estéril.
- 3) Agitar el tubo con vortex durante 30-60 segundos a máxima velocidad, para liberar la mayor parte del suelo de la rizosfera de las raíces.
- 4) Dejar los tubos en posición vertical reposando 5 minutos.
- 5) Retirar las raíces del tubo (para quedarnos solo con el suelo adherido) y coloralas en un nuevo tubo de 2ml estéril con 1.5 ml de solución PBS.
- 6) Centrifugar los tubos falcon de 15 ml a 5000 x g durante 15 min.
- 7) Eliminar el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta para quedarnos con el pellet (suelo rizosférico).
- 8) Agregar 1ml de agua destilada estéril en el pellet resultante y transferirlo a un microtubo (1,5 ml) con la ayuda de una micropipeta de 1000 ul (las puntas pueden ser cortadas para permitir el ingreso de material).
- 9) Centrifugar el microtubo a 5000 x g durante 2 min y eliminar el sobrenadante.
- 10) Almacenar el pellet a -20°C hasta la extracción de ADN.

NOTA: Al final del procedimiento se necesita obtener 0.25 g de suelo rizosférico.

REFERENCIAS:

- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., ... & Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E911-E920.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., ... & Dangl, J. L. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90.
- Schneijderberg, M., Cheng, X., Franken, C., de Hollander, M., van Velzen, R., Schmitz, L., ... & Bisseling, T. (2020). Quantitative comparison between the rhizosphere effect of Arabidopsis thaliana and co-occurring plant species with a longer life history. *The ISME journal*, 14(10), 2433-2448.
- Oyserman, B. O., Flores, S. S., Griffioen, T., Pan, X., van der Wijk, E., Pronk, L., ... & Raaijmakers, J. M. (2022). Disentangling the genetic basis of rhizosphere microbiome assembly in tomato. *Nature communications*, 13(1), 1-16.
- Gaete, A., Pulgar, R., Hodar, C., Maldonado, J., Pavez, L., Zamorano, D., ... & Mandakovic, D. (2021). Tomato cultivars with variable tolerances to water deficit differentially modulate the composition and interaction patterns of their rhizosphere microbial communities. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Elaborado por:
Iván Astudillo Estévez

ANEXO 2: Pipeline QIIME 2 para procesamiento de secuencias

ACCIÓN 1.1:

```
qiime tools import \
  --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
  --input-path FastQ \
  --input-format CasavaOneEightSingleLanePerSampleDirFmt \
  --output-path emp-paired-end-sequences.qza
```

Output artifacts:

- emp-paired-end-sequences.qza

1. **Generación de resumen (summary):** para visualizar cuántas secuencias se obtuvieron por muestra (demultiplexed data).

ACCIÓN 2:

```
qiime demux summarize \
  --i-data emp-paired-end-sequences.qza \
  --o-visualization emp-paired-end-sequences.qzv
```

2. **Denoising:** para determinar los parámetros en base a la calidad de las secuencias (Quality score) y cortar (trimming) los reads para eliminar el ruido.

ACCIÓN 3.1:

OPCIÓN 1
<p style="text-align: center;">DADA2</p> <pre>qiime dada2 denoise-paired \ --i-demultiplexed-seqs emp-paired-end-sequences.qza \ --p-trim-left-f 20 \ --p-trim-left-r 20 \ --p-trunc-len-f 230 \ --p-trunc-len-r 230 \ --o-table table-dada2.qza \ --o-representative-sequences rep-seqs-dada2.qza \ --o-denoising-stats denoising-stats-dada2.qza</pre>
<p>Output artifacts:</p> <ul style="list-style-type: none"> - denoising-stats-dada2.qza - rep-seqs-dada2.qza - table-dada2.qza <p><i>Comentario:</i> <i>En esta etapa, ya se tiene artefactos que contienen la FEATURE TABLE, las</i></p>

secuencias características correspondientes y las estadísticas del denoising.

3.2 Generación de resúmenes (Feature table y FeatureData summaries)

ACCIÓN 3.2:

DADA2

```
qiime feature-table summarize \
  --i-table table-dada2.qza \
  --o-visualization table-dada2.qzv \
  --m-sample-metadata-file
galapagos_tomato-metadata.tsv

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs-dada2.qza \
  --o-visualization rep-seqs-dada2.qzv

qiime metadata tabulate \
  --m-input-file denoising-stats-dada2.qza \
  --o-visualization denoising-stats-
dada2.qzv
```

Output visualizations:

- table-dada2.qzv
- denoising-stats-dada2.qzv
- rep-seqs-dada2.qzv

4. Filtrado de secuencias:

ACCIÓN 4.1:

```
qiime feature-table filter-samples \
  --i-table table-dada2.qza \
  --p-min-frequency 9901 \
  --o-filtered-table filtered-table-dada2.qza
```

5. Filtrado de rep-seqs

ACCIÓN 5:

```
qiime feature-table filter-seqs \
  --i-data rep-seqs-dada2.qza \
  --i-table filtered-table-dada2.qza \
  --o-filtered-data filtered-rep-seqs-
dada2.qza
```

6. Visualización de feature table filtrada:

ACCIÓN 6:

```
qiime feature-table summarize \
  --i-table filtered-table-dada2.qza \
  --o-visualization filtered-table-dada2.qzv \
  --m-sample-metadata-file
galapagos_tomato-metadata.tsv

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data filtered-rep-seqs-dada2.qza \
  --o-visualization filtered-rep-seqs-
dada2.qzv
```

7. Clasificación taxonómica:**ACCIÓN 7.1:**

```
qiime feature-classifier classify-sklearn \
  --i-classifier silva-138-99-nb-
classifier.qza \
  --i-reads rep-seqs-dada2.qza \
  --o-classification taxonomy-silva138.qza
```

Output artifacts:

```
- taxonomy-silva138.qza
```

ACCIÓN 7.2: #visualizar (opcional)

```
qiime metadata tabulate \
  --m-input-file taxonomy-silva138.qza \
  --o-visualization taxonomy-silva138.qzv
```

Output visualizations:

```
- taxonomy-silva138.qzv
```

8. Composición taxonómica de las muestras con plots de barras**ACCIÓN 8:**

```
qiime taxa barplot \
  --i-table table-dada2.qza \
  --i-taxonomy taxonomy-silva138.qza \
  --m-metadata-file galapagos_tomato-
metadata.tsv \
  --o-visualization taxa-bar-plots-
silva138.qzv
```

Output visualizations:

```
- taxa-bar-plots-silva138.qzv
```

ANEXO 3: Fotografía de *S. galapagense* tomada en la salida de campo por la isla Isabela de las Islas Galápagos.

