UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Exploración del Microbioma Funcional en Especies de Tomate Endémicas e Introducidas en las Islas Galápagos

.

Samuel Cortese Mc Lean

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Exploración del Microbioma Funcional en Especies de Tomate Endémicas e Introducidas en las Islas Galápagos

Samuel Cortese Mc Lean

Nombre del profesor, Título académico **Pieter Marinus Johannes van 't Hof, PhD**

Quito, 18 de diciembre de 2024

© 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: Samuel Cortese Mc Lean

Código: 00321528

Cédula de identidad: 1720039492

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

En este estudio se analiza la composición y la funcionalidad del microbioma de la rizósfera en cuatro especies de tomate encontradas en las Islas Galápagos: *Solanum cheesmaniae* y *Solanum galapagense* (endémicas), *Solanum pimpinellifolium* (silvestre del continente) y *Solanum lycopersicum* (domesticada). Para entender cómo el microbioma contribuye a la resistencia de las especies hacia formas de estrés, se analizó la alfa y la beta diversidad al igual que la composición taxonómica del microbioma de suelo. Se recolectaron muestras de rizósfera en cinco islas del archipiélago. De estas se extrajo y se secuenció ADN utilizando el gen 16S rRNA como marcador para bacterias. Por otro lado, se realizó un bioensayo comparando la resistencia de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* al psílido *Bactericera cockerelli* bajo distintas condiciones de suelo. Los resultados revelaron que las especies silvestres y endémicas poseen una mayor riqueza y diversidad bacteriana, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con *S. lycopersicum*. Los géneros bacterianos dominantes incluyeron *Rhizobium*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Nocardioides*, los cuales cumplen funciones importantes como la absorción de nutrientes y la defensa contra patógenos. El bioensayo mostró que *S. lycopersicum* es más vulnerable a la infección por *B. cockerelli*, especialmente en suelos vivos, sugiriendo una pérdida de asociaciones benéficas muy posiblemente debido a la domesticación. En conclusión, en este trabajo se resalta el rol crucial del microbioma en la capacidad de adaptación y de resistencia de las especies de tomate frente a condiciones ambientales y agentes bióticos. Además, mediante estudios que profundicen más, se puede llegar a provechar del microbioma funcional podría mejorar la resiliencia de *S. lycopersicum*, lo que puede tener implicaciones positivas para la agricultura sostenible en el futuro

Palabras clave: Microbioma funcional, Rizósfera, *Solanum*, Tomate, Tolerancia contra herbívoros, Islas Galápagos, Domesticación, Adaptación.

ABSTRACT

This study analyzes the composition and functionality of the rhizosphere microbiome in four tomato species found at the Galápagos Islands: *Solanum cheesmaniae* and *Solanum galapagense* (endemic), *Solanum pimpinellifolium* (wild from the continent), and *Solanum lycopersicum* (domesticated). To understand how the microbiome contributes to species resistance to stress, alpha and beta diversity, as well as the taxonomic composition of the soil microbiome were analyzed. Rhizosphere samples were collected from five islands within the archipelago. DNA was extracted and sequenced using the 16S rRNA gene as a marker for bacteria. In addition, a bioassay was conducted comparing the resistance of *S. lycopersicum* and *S. pimpinellifolium* to the psyllid *Bactericera cockerelli* under different soil conditions. The results revealed that wild and endemic species possess greater bacterial richness and diversity, with statistically significant differences compared to *S. lycopersicum*. The dominant bacterial genera included *Rhizobium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Nocardioides*, which play essential roles such as nutrient absorption and pathogen defense. The bioassay showed that *S. lycopersicum* is more vulnerable to infection by *B. cockerelli*, especially in live soils, suggesting a loss of beneficial associations likely due to the domestication process. In conclusion, this work highlights the crucial role of the microbiome in the adaptability and resistance of tomato species to environmental conditions and biotic agents. Furthermore, with more in-depth studies, harnessing the potential of the functional microbiome could enhance the resilience of *S. lycopersicum*, which may have positive implications for sustainable agriculture in the future

Keywords: Functional microbiome, Rhizosphere, *Solanum*, Tomato, Herbivore tolerance, Galápagos Islands, Domestication, Adaptation.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....11
Métodos.....15
Resultados.....18
Discusión.....21
Conclusiones.....25
Tablas.....26
Figuras.....27
Referencias bibliográficas.....30
Anexos.....32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación pairwise para diferencias de alfa diversidad entre especies……...26

Tabla 2. Comparación pairwise para diferencias de beta diversidad entre especies……26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alfa Diversidad de la rizósfera de cuatro especies del género *Solanum*……..27

Figura 2. Matriz de distancia Bray-Curtis para beta diversidad……...……28

Figura 3. Abundancia relativa de los 5 géneros más abundantes en la rizósfera……..…28

Figura 4. Cuantificación de infección por *B. cockerelli* al cabo de 20 días…….……29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Puntos de muestreo en las Islas Galapagos.....32

Anexo 2: Oviposturas de *Bactericera cockerelli*.....32

Anexo 3: Ninfas de *Bactericera cockerelli*.....33

Anexo 4: Comparación de indices de alfa diversidad.....33

INTRODUCCIÓN

El fruto de la especie de tomate *Solanum lycopersicum* es el segundo vegetal más consumido a nivel mundial (Islam, et al., 2023). Esta especie ha experimentado un proceso de domesticación en el cual individuos con características deseables para el consumo humano, como, por ejemplo, frutos de mayor tamaño, han sido seleccionados para favorecer un mayor rendimiento. Esto ha derivado en la pérdida de la diversidad genética dentro de las poblaciones de tomate, y con esta la capacidad de responder y adaptarse a cambios en el ambiente (Raaijmakers & Kiers, 2022). En consecuencia, los cultivos de tomate son vulnerables a factores bióticos y abióticos, haciendo que se las cosechas a nivel mundial sufran grandes pérdidas (Islam, et al., 2023).

Dentro del del género *Solanum*, el tomate moderno tiene especies silvestres emparentadas que toleran varias formas de estrés y proliferan en ambientes cuyas condiciones son mucho más hostiles y variables. En este sentido, *Solanum pimpinellifolium* es la especie con mayor cercanía filogenética, y su centro de origen se encuentra localizado desde el sur del Ecuador hasta el norte de Chile (Sarango Flores, et al., 2023). Esta planta es rastrera, cuenta con frutos de mucho menor tamaño y puede crecer entre muchas otras especies vegetales. Actualmente se ha esparcido a otras regiones de América del Sur dado que esta es esporádicamente cultivada (Razifard, et al., 2020). Esto ha contribuido que esta especie llegue a las Islas Galápagos en donde crece de forma silvestre (Sarango Flores, et al., 2023).

En el archipiélago de las Galápagos, existen dos especies endémicas del género Solanum. Estas son *Solanum cheesmaniae* y *Solanum galapagense*, ambas comparten muchas cualidades y se destacan por proliferar en ambientes desérticos con poca disponibilidad de agua y nutrientes, alta salinidad, entre otros, donde muy pocas especies de plantas pueden desarrollarse (Pailles, et al., 2017). Un ejemplo de esto son los campos de roca volcánica en

las Islas, donde es común encontrar individuos de ambas (Darwin, et al., 2003). Al observar estas especies tan adaptadas a su ambiente, es consecuente preguntarse si es que estas adaptaciones pueden ser transferidas a su pariente domesticado *S. lycopersicum*, y hasta qué punto. Actualmente se está realizando investigación para responder esta pregunta y a través de esto poder resolver el problema de la vulnerabilidad de *S. lycopersicum* (Raaijmakers & Kiers, 2022). Ya se ha establecido que la resistencia al estrés es principalmente mediada por la composición genética de las plantas, en todo caso al tener una relación tan estrecha con su microbioma, se puede argumentar que este actúa como un "segundo genoma". Por lo cual también se le puede cierta importancia en la capacidad de tolerar presiones ambientales (Berg, et al., 2014).

El microbioma es el conjunto de las comunidades de microorganismos junto a sus genes, productos e interacciones, que se encuentran en directa relación con un organismo eucariota en este caso las plantas de tomate. El microbioma interviene y regula las interacciones que ocurren entre una planta y el medio ambiente que la rodea. La composición de este determina la capacidad de la planta para responder a diferentes estímulos y formas de estrés tanto bióticas como abióticas (Gutierrez & Grillo, 2022). El microbioma es específico para cada sección de la planta y se clasifica en tres formas principales: la rizosfera, que corresponde al suelo que rodea las raíces de las plantas; la endosfera, que abarca el interior de los órganos de la planta, tanto subterráneos como aéreos; y la filósfera, que incluye la parte foliar de la planta (Pantigoso, et al., 2022). Asimismo, dentro del microbioma se encuentra la microbiota que representa a los microoganismos, excluyendo a sus metabolitos e interacciones. Por otro lado, el microbioma funcional hace referencia a aquellos microoganismos, genes, procesos metabólicos e interacciones que cumplen una función que influye de manera directa sobre la planta (Cordovez, et al., 2019, Berg, et al., 2014).

El microbioma funcional de las plantas contribuye con funciones esenciales como la absorción de nutrientes, pero también puede mediar la tolerancia a factores bióticos (patógenos) o abióticos (condiciones ambientales), los cuales pueden representar formas de estrés significativas (Fan, et al., 2023). Con respecto al tomate, el microbiomaa funcional juega un papel clave en varios procesos muy importantes para la planta. Para empezar, microorganismos como *Azospirillum* y *Bacillus* facilitan la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la adquisición de hierro, lo que incrementa la disponibilidad de nutrientes esenciales. Bacterias como *Pseudomonas* y *Enterobacter* ayudan al tomate a resistir altas concentraciones de salinidad y sequía mediante la optimización de la absorción de agua y nutrientes. Asmismo, géneros bacterianos como *Bacillus* y *Streptomyces*, producen compuestos antimicrobianos que fortalecen la resistencia a infecciones (Sarango Flores, et al., 2023).

Los cultivos de *S. lycopersicum*, son afectados por muchas de estas formas de estrés. Igualmente, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* y a *S. galapagense* en el ecosistema de las Islas Galápagos también sufren de condiciones hostiles. Claramente, estas tres especies están mucho más adaptadas a dichas condiciones (Sarango Flores, et al., 2023), y dado que el microbioma ha sido reconocido como un factor principal en la resistencia a muchas de estas presiones ambientales, descifrar su papel en la adaptación del tomate en las Galápagos puede elucidar como el tomate comercial puede recobrar la resiliencia de sus parientes silvestres. Por lo cual en este estudio se investigó la composición bacteriana de la microbiota en la rizósfera mediante el uso de secuenciamiento y un posterior análisis bioinformático. El microbioma en individuos del género *Solanum* nunca antes había sido estudiado en el archipiélago, por lo cual, los resultados presentados a continuación son los primeros en este ecosistema.

Para explorar esta relación con otro enfoque, se puede caracterizar la respuesta de las plantas a diferentes formas de estrés mediante bioensayos. En este estudio se buscó analizar la

respuesta de dos especies de tomate, *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* hacia una fuente de estrés biótico. Para esto se utilizó a *Bactericera cockerelli*, una especie de psílido nativa de América del Sur, la cual actualmente se encuentra en todo el continente. Es uno de los patógenos de mayor importancia hacia los cultivos de solanáceas, y en este caso actuó como un modelo de estrés biótico (Melgoza Villagómez, et al., 2018). Para comparar el rol del microbioma se utilizaron diferentes condiciones de suelo. Para empezar, las plantas fueron cultivadas en suelos provenientes de la región de Loja, en el sur del Ecuador, la cual está dentro del centro de origen de *S. pimpinellifolium* (Gibson, et al., 2020). Los suelos empleados venían de un entorno silvestre y de un entorno agrícola. El objetivo con estos suelos era emular el microbioma de una región donde el género *Solanum* se ha desarrollado por un periodo considerable de tiempo. Para poder determinar el efecto del microbioma, se utilizó un control negativo el cual consistía en suelo esterilizado. Finalmente, cada uno de los suelos fue mezclado en proporción 1:4 con arena estéril para simular las condiciones que ocurren en ambientes como las Islas Galápagos.

Tomando todo esto en cuenta, en este estudio se definieron los siguientes objetivos: El primero es describir las diferencias y cambios en la composición taxonómica del microbioma del tomate entre especies de tomate endémicas y domesticadas presentes en las Islas Galápagos. El segundo objetivo es identificar los taxones bacterianos asociados a la rizosfera de las especies de tomate reclutados diferencialmente. Finalmente, el tercer objetivo es determinar la influencia de suelos nativos del centro de origen y agrícolas en la respuesta de las plantas de tomate hacia formas de estrés biótico mediante una infección de *B. cockerelli*.

MÉTODOS

Colecta de muestras

Para obtener las muestras de microbioma de las cuatro especies de tomate presentes en las Islas Galápagos, se colectaron muestras de las raíces de tomate en las islas Isabela, Floreana, Santa Cruz y San Cristobal en julio de 2022, y en la isla Santiago en abril de 2023 (Anexo 1). Se colectaron un total de 62 individuos de diferentes poblaciones de tomate. De cada individuo muestreado se tomaron muestras de rizósfera, filósfera y del suelo circundante a cada planta. Para la muestra de rizósfera se tomaron secciones de raíz con suelo adherido y se depositó la muestra en tubos de 5 ml con solución de preservación LifeGuard™ DNA Preservation Solution (QIAGEN, USA). Para la filósfera se tomaron de dos a tres hojas de diferentes secciones de la planta en tubos con LifeGuard™ DNA Preservation Solution (QIAGEN, USA). Todas las muestras fueron transportadas en coolers con icepacks en campo, hasta su depósito temporal en refrigeración (4°C), y almacenamiento final a -20°C en laboratorio.

Extracción de ADN de suelo rizosférico

Posteriormente, las muestras de rizósfera fueron procesadas en el laboratorio del Instituto de Microbiología de la USFQ en el campus Cumbayá, para lo cual las raíces en LifeGuard™ DNA Preservation Solution (QIAGEN, USA) fueron sometidas a 2 min de vortex para liberar el suelo adherido. Las raíces fueron separadas en otros tubos con solución PBS. El sedimento de suelo (suelo rizosférico) en la solución de preservación fue utilizado para extraer el ADN. Para esto, se utilizó el kit DNEasy PowerSoil Pro (QIAGEN, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad de DNA total fue cuantificada mediante NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras de ADN fueron secuenciadas en la compañía Genome Quebec (Montreal, Canadá) con la plataforma Illumina

NextSeq (Illumina, USA). Se secuenciaron las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA, el cual es un marcador molecular específico para bacterias.

Análisis bioinformático

Posteriormente el análisis bioinformático se enfocó en las secuencias del marcador 16S. El preprocesamiento para obtener la tabla de ASVs y la asignación taxonómica fue realizado en DaDa2, y el resto del análisis de la estructura y composición de comunidad bacteriana fue realizado en R (Cordovez, et al., 2021). La asignación taxonómica con 16S permitió llegar hasta el nivel de género y a partir de este punto se analizaron alfa y beta diversidad al igual que abundancias relativas. La alfa diversidad fue evaluada mediante varios índices (Anexo 4) y la significancia estadística fue evaluada mediante una prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. La beta diversidad fue evaluada mediante una matriz de distancia Bray-Curtis En enfoque principal fue el de la comparación de la microbiota bacteriana entre las cuatro especies diferentes del género *Solanum*.

Bioensayo

Se cultivaron individuos de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker (Galassi Sementi, Italia) y *S. pimpinellifolium* (ECU 2278) a partir de semillas obtenidas del Banco de Germoplasma de la Dirección Nacional de Recursos Fitogenéticos (DNAREF) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Las semillas fueron desinfectadas mediante dos lavados con etanol al 75% y un lavado posterior con hipoclorito de sodio al 1.5% para finalmente tener un ultimo enjuague con agua destilada.

Después de siete días, las semillas germinadas fueron transferidas a dos diferentes tipos de suelo: nativo y suelo con manejo agrícola mezclados con arena estéril en proporción (1:4). Ambos suelos provenían de la región de Loja que se encuentra dentro del centro de origen de *S. pimpinellifolium*. La segunda variable fue el tratamiento para cada suelo: Una parte de

ambos suelos fue esterilizada mediante un autoclave para que la mitad de las plantas fuera cultivada en un suelo estéril, que sirvió como un control negativo para la presencia de microoganismos en la rizósfera. Todas las pantas fueron regadas con 5ml de solución Hoagland cada 3 días por las primeras 3 semanas, y en las siguientes 3 semanas fueron regadas con 5ml de agua.

Al cabo de 6 semanas, las plántulas fueron transportadas a los invernaderos de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP para la infección con una pareja de individuos adultos de *Bactericera cockerelli* por planta. Los psílido fueron donados por el Centro internacional de la Papa (CIP). Estos fueron sexados mediante una clasificación de su morfología, donde se observó la estructura abdominal al igual que las alas en un estereomicroscopio. Cada pareja fue colocada en directo contacto con la tercera hoja a partir del meristema apical, y fueron confinadas dentro de un bolsa de malla para evitar su propagación. La infección fue medida a los 7 y 20 días. Se cuantificó el número de oviposturas (Anexo 2) al igual que el número de ninfas (Anexo 3) en la parte foliar de las plantas.

RESULTADOS

Con el objetivo de describir las diferencias y cambios en la composición taxonómica del microbioma del tomate entre especies de tomate endémicas y domesticadas presentes en las Islas Galápagos, se ejecutó el análisis bioinformático de la secuencias de las comunidades bacterianas, el cual se enfocó en determinar cuáles eran las diferencias principales en la rizósfera de las cuatro especies de tomate. Para esto se analizaron diferentes formas de diversidad. El análisis de diversidad alfa determinado mediante los índices de Shannon y Simpson, los cuales analizan la igualdad de las comunidades en cada muestra, no representaban diferencias significativas entre la diversidad encontrada ente las cuatro especies del género *Solanum* (Anexo 4). No obstante, hay que recalcar que si hubo diferencias significativas en el índice Chao1. Este índice es especialmente relevante para los estudios de diversidad microbiana. Dado que, a diferencia de los otros dos índices mencionados, el índice Chao1 toma en cuenta a las asignaciones taxonómicas más escasas. Esto proporciona información más relevante porque permite determinar cuáles especies tienen una mayor riqueza de géneros bacterianos en su suelo.

Tomando esto en cuenta, se puede ver que la Figura 1 indica que tanto *S. cheesmaniae* como *S. galapagense* tienen una mayor riqueza que *S. lycopersicum*. También hay que destacar que el mayor valor del índice Chao1 lo tiene *S. pimpinellifolium*. Esto quiere decir que las tres especies que crecen de manera silvestre en las Islas Galápagos tienen una mayor riqueza en comunidades bacterianas en contraste con su contraparte domesticada que crece en suelos con manejo agrícola.

Los valores de la Tabla 1 nos permiten determinar que las diferencias observadas entre *S. lycopersicum* y sus contrapartes silvestres son en realidad relevantes y sobre todo

estadísticamente significativas. De esta manera, se evidencia que la alfa diversidad de las comunidades bacterianas del tomate domesticado *S. lycopersicum* es significativamente diferente al de las especies endémicas *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, al igual que al de *S. pimpinellifolium*. Esto indica que existe una distancia muy marcada entre la riqueza del microbioma de la especie domesticada y las especies endémicas y silvestres.

Al analizar la riqueza de las comunidades, es muy importante complementar esta evaluación con una comparación de la composición de las comunidades bacterianas entre cada especie de tomate. Para esto, en la Figura 2 se usa un Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) basadao en la disimilaridad Bray-Curtis de las comunidades bacterianas de la rizósfera. El cual indica que las dos especies endémicas: *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, están muy estrechamente relacionadas entre sí, mientras que se alejan de *S. lycopersicum*, y *S. pimpinellifolium* siendo un intermediario entre estas. El hecho de que los clústeres señalados definan las diferencias entre especies también debe considerado junto a que todos estos clústeres sobrelapan entre sí, indicando que si existen ciertas similitudes comunes entre la rizósfera de todas las especies.

Mas allá de las diferencias que pueden ser visualmente identificadas en el grafico de NMDS, es necesario verificar si estas en realidad son relevantes. La Tabla 2 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones, no obstante, hay que destacar que las diferencias más grandes se encuentran entre las especies endémicas *S. cheesmaniae* y *S. galapagense* y las especies introducidas *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*. Esto por supuesto puede ocurrir gracias al grado de adaptación el ambiente, no obstante, es necesario comprobar esto al analizar la composición de las comunidades bacterianas.

Para analizar la composición bacteriana de forma más detallada es necesario realizar una asignación taxonómica. Utilizando el gen 16S el máximo grado de resolución taxonómica al que se puede llegar es al de género, por lo tanto, se analizaron los 5 géneros más abundantes en cada muestra, como se puede ver en la Figura 3. De estos, se destaca la presencia de 4 géneros pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, también llamados rizobios, pero también se encuentran los géneros *Bacillus*, *Nocardioides, Streptomyces* y *Mycobacterium.*

El bioensayo realizado sirvió para caracterizar la funcionalidad del microbioma de forma más específica con respecto a una cierta forma de estrés ambiental: el estrés biótico. Como se puede apreciar en la Figura 4, *S. lycopersicum* fue mucho más vulnerable a la infección de *B. cockerelli*, mientras que los individuos de *S. pimpinellifolium* casi no evidenciaron infección alguna, en oviposturas y tampoco en número de ninfas, lo que puede darse a su mayor grado de adaptación a un entorno con diferentes formas de estrés biótico. Si embargo, también hay que recalcar que los individuos de *S, lycopersicum* fueron mucho más vulnerables a las oviposturas de *B. cockerelli* cuando estos fueron cultivados en un suelo vivo.

DISCUSIÓN

La caracterización de la composición microbiana presente en la rizósfera de individuos de las 4 especies de tomate encontradas en las Islas Galápagos permitió determinar cuáles eran los factores clave para distinguir especies más y menos acomodadas al ambiente. Este grado de adaptación depende de varios factores. Para empezar, está claro que *S. cheesmaniae* y *S. galapagense* al ser endémicas del archipiélago, han desarrollado varias adaptaciones durante su proceso evolutivo. Es evidente que muchas de estas, son genes que confieren características fenotípicas beneficiosas, no obstante, hay que considerar que la capacidad de ajuste está dictada en un grado considerable por su microbioma. A través de las generaciones, los individuos de las especies endémicas de tomate han estado expuestas a diversas presiones características del ambiente de las Galápagos, lo que les ha hecho adaptarse a estos entornos, así como depender del reclutamiento de grupos microbianos específicos para poder realizar varias funciones clave como, por ejemplo, la captura de nutrientes. Dentro de los géneros más abundantes de las comunidades bacterianas que comparten los tomates introducidos y endémicos, se encuentran los rizobios, estos son una familia de bacterias que se caracteriza por jugar un papel clave en el proceso de absorción de nitrógeno en las plantas, lo cual es una característica esencial para un microbioma estable que resiste cambios en el ambiente sin perturbar su funcionalidad (Mendes, et al., 2015). Además de los rizobios, también se identificaron otros géneros bacterianos de relevancia. Las bacterias del género *Bacillus* son reconocidas por su capacidad para promover el crecimiento vegetal y controlar fitopatógenos. (Villarreal-Delgado et al., 2018). Asimismo, está el género *Streptomyces* el cual se destaca por su papel en la descomposición de materia orgánica, pero también por generar metabolitos como antibióticos (Wanner & Kirk, 2015). Por otro lado, en el contexto de la ecología del suelo, el género *Nocardioides* se ha destacado por su habilidad para degradar compuestos orgánicos complejos

y contaminantes (Ma et al., 2023). Por último, las especies de *Mycobacterium* pueden participar en la degradación y mineralización de materia orgánica ayudando al flujo de nutrientes en el suelo (Karmakar, et al., 2021). La presencia de todos estos géneros en la rizósfera contribuye a un microbioma robusto y funcional.

En la microbiota bacteriana de las especies endémicas *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, al igual que en *S. pimpinellifolium* se puede observar que al haberse desarrollado casi exclusivamente en un entorno silvestre con diferentes formas de estrés, estas especies han tenido que recurrir a reclutar una mayor cantidad de asociaciones benéficas con consorcios microbianos (Raaijmakers & Kiers, 2022). En el caso de estas tres especies, esta dependencia en las asociaciones microbianas se expresa como una mayor riqueza, tal como se evidenció al analizar la alfa diversidad con el índice Chao1. Esto indicaría que potencialmente puede existir una correlación entre el grado de adaptación al ambiente y el número de especies bacterianas en la rizósfera.

Mas allá del índice de riqueza de cada comunidad bacteriana, es necesario determinar qué tan diferentes son estas comunidades entre sí, es decir la variación entre muestras. Para esto se pueden ver los resultados de la matriz de distancia Bray-Curtis. Al tener diferencias significativas entre todas las especies se puede establecer que cada una de ellas recluta una comunidad bacteriana específica para sus necesidades, lo que puede deberse a que dentro del proceso evolutivo de cada especie se desarrollan necesidades y afinidades que dictaminan la composición del microbioma. No obstante, el estadístico NMDS muestra que todos los clusters se sobrelapan entre sí, recalcando que si existen similitudes entre las diferentes composiciones rizosféricas. Esto puede ser ocasionado por el ecosistema donde se dio el muestreo, dado que, al ser relativamente joven, el archipiélago no ha tenido el tiempo suficiente para desarrollar una capa de suelo comparable a la de otras regiones, evitando que existan diferencias más marcadas en el suelo de distintas áreas (Pailles, et al., 2017).

Este ecosistema es precisamente uno de los factores que contribuyen en mayor medida a la composición microbiana. Dado que al presentar tantas presiones ambientales; como la sequía, las altas temperaturas, la alta salinidad o la falta de materia orgánica; inclina a las especies del género *Solanum* a depender más de su microbioma. Las comunidades de microoganismos pueden responder de forma mucho más rápida a los cambios en su entorno que las plantas, lo que hace que estas sean la primera línea de defensa hacia estas formas de estrés. Esto se evidencia en la Fig. 3, dado que todos los principales géneros bacterianos presentes tienen alguna función benéfica hacia sus hospedadores vegetales, y han sido caracterizados como componentes de un suelo saludable y resiliente a cambios en el ambiente (Pandey, et al., 2018).

Con respecto al bioensayo, este permite elucidar como la funcionalidad del microbioma impacta la resistencia del género *Solanum* hacia plagas. Al comparar diferentes tipos de suelo junto a diferentes tratamientos se pudo determinar cómo las dos especies analizadas, *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*, reaccionaban al estrés biótico bajo diferentes condiciones de suelo. Los resultados indicaron que *S. lycopersicum* tuvo una propensión a la infección considerablemente mayor, dado que en sus hojas se observó un número de huevos (oviposturas) y de psílidos inmaduros (ninfas) mucho más elevado que en su contraparte silvestre *S. pimpinellifolium*. La mayor susceptibilidad a la infección por *B. cockerelli* de parte de *S. lycopersicum* puede ser atribuida a su proceso de domesticación, debido a que gracias a este *S. lycopersicum* se ha desarrollado en un entorno agrícola donde no ha sido expuesto a tantas presiones ambientales, con el objetivo de maximizar su rendimiento. Esto también puede hacer ocasionado que este pierda microoganismos que establecen asociaciones benéficas, lo que explicaría la menor resistencia y también corroboraría su menor índice de alfa diversidad (Liu, et al., 2020).

Asimismo, esta pérdida de riqueza también daría razón a que *S. lycopersicum* fuera más susceptible a la infección en un suelo vivo, es decir con una microbiota de suelo proveniente del centro de origen de *S. pimpinellifolium* (Cordovez, et al., 2021). Dado que al no tener la capacidad de establecer relaciones benéficas con microorganismos que podrían prevenir infecciones de parte de patógenos, *S. lycopersicum* se vuelve mucho más vulnerable a que su rizósfera sea invadida por microbios que aumenten los niveles de estrés biótico en el tomate, haciéndola más vulnerable a una infección, a pesar de que esta ocurra en una sección diferente de la planta. Todas estas observaciones sobre la funcionalidad del microbioma en el tomate, y más concretamente sobre la composición de sus comunidades bacterianas, permiten elucidar sobre como los individuos del género *Solanum* se relacionan con su ambiente por medio de microorganismos, lo que puede permitir caracterizar cuales interacciones y propiedades pueden ser aprovechadas para mejorar el nivel de adaptación al ambiente de los individuos de la especie menos adaptada de este género, *S. lycopersicum*.

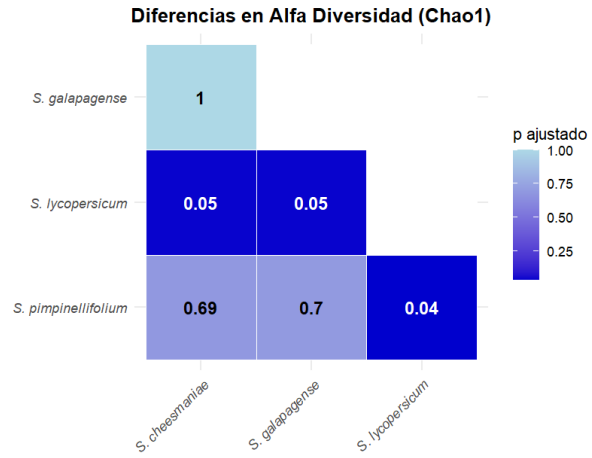
CONCLUSIONES

Tomando en cuenta toda la información presentada anteriormente se puede determinar que el proceso de domesticación del tomate ha reducido significativamente la riqueza y diversidad taxonómica del microbioma en *S. lycopersicum*, en comparación con sus parientes silvestres y endémicos. Esto se manifiesta en una menor capacidad para establecer relaciones benéficas con microorganismos clave, como los rizobios, limitando su habilidad para adaptarse a entornos hostiles y resistir factores de estrés. En contraste, las especies silvestres y endémicas presentan microbiomas más ricos y especializados, lo que les confiere mayor resiliencia en ambientes hostiles. Asimismo, se puede establecer que la composición del microbioma varía entre especies, siendo más similar entre especies más cercanas evolutivamente, lo que es un reflejo de su adaptación a las condiciones ambientales en las Galápagos. No obstante, todas las especies comparten ciertos géneros bacterianos fundamentales, posiblemente debido al ecosistema joven y homogéneo del archipiélago. En términos de funcionalidad, el bioensayo demostró que *S. pimpinellifolium* mostró mayor resistencia a *Bactericera cockerelli* en comparación con *S. lycopersicum*. Además, la presencia de un microbioma vivo en el suelo afectó negativamente a *S. lycopersicum*, sugiriendo una posible interacción desfavorable con microorganismos, lo que indica que el microbioma puede llegar a jugar un papel clave en la resistencia a estrés biótico.

Para concluir, la información presentada en este estudio puede servir para caracterizar como la funcionalidad del microbioma ayuda a las especies silvestres y endémicas del género *Solanum*, y como estas adaptaciones pueden potencialmente transmitirse a *S. lycopersicum*. Para caracterizar estas relaciones de mejor manera, futuras investigaciones deberían enfocarse en la descripción funcional del microbioma mediante metagenómica para identificar los roles específicos de los microorganismos clave.

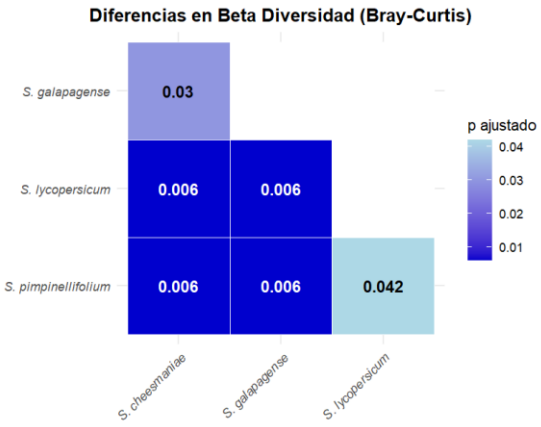
TABLAS

Tabla 1. Comparación pairwise para diferencias de Alfa Diversidad entre especies



Descripción: Se muestra una comparación pairwise entre las cuatro especies de tomate. Dentro de cada celda se encuentra el valor p ajustado, el cual junto a la escala de colores sirve para determinar la significancia de cada una de las comparaciones del valor del índice Chao1.

Tabla 2. Comparación pairwise para diferencias de Beta Diversidad entre especies



Descripción: La tabla evidencia las diferencias entre especies mediante la distancia Bray-Curtis. Cada una de las celdas muestra el valor de p ajustado para la significancia de cada comparación. Este valor, junto a la escala de color permite determinar cuáles diferencias son estadísticamente significativas.

FIGURAS

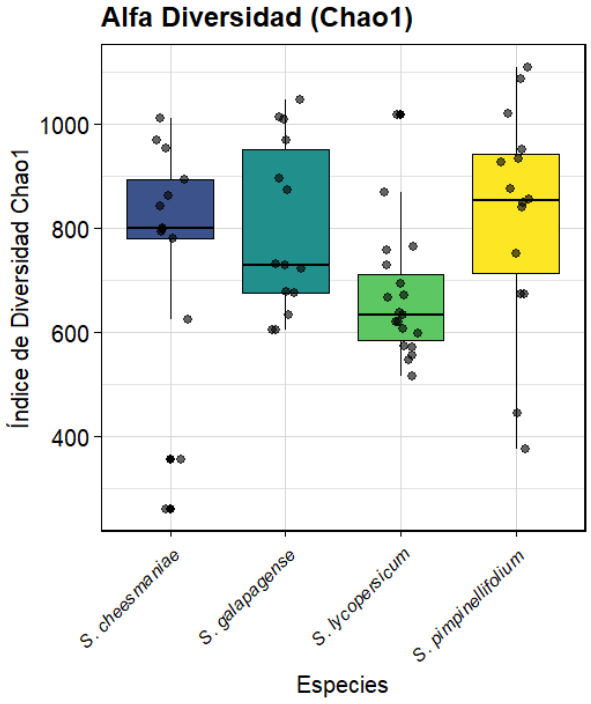


Figura 1. Alfa Diversidad de la rizósfera de cuatro especies del género *Solanum*.

Descripción: Se evidencia el índice de alfa diversidad promedio para las comunidades bacterianas presentes en el suelo de las cuatro especies de tomate analizadas. El índice utilizado fue Chao1. Se presenta el promedio de todas las muestras para cada una de las especies.

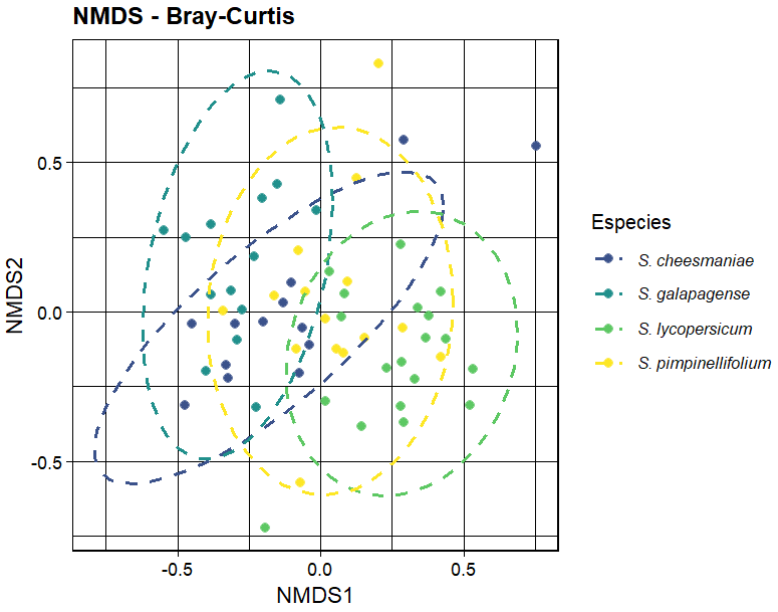


Figura 2. Matriz de distancia Bray-Curtis para beta diversidad.

Descripción: Se muestra la beta diversidad mediante el estadístico NMDS para determinar la diferencia relativa entre la composición bacteriana de las diferentes muestras. Los puntos de diferentes colores representan las especies de tomate de este estudio. Cada uno de los clusters evidencia las muestras de rizósfera de cada una de las diferentes especies.

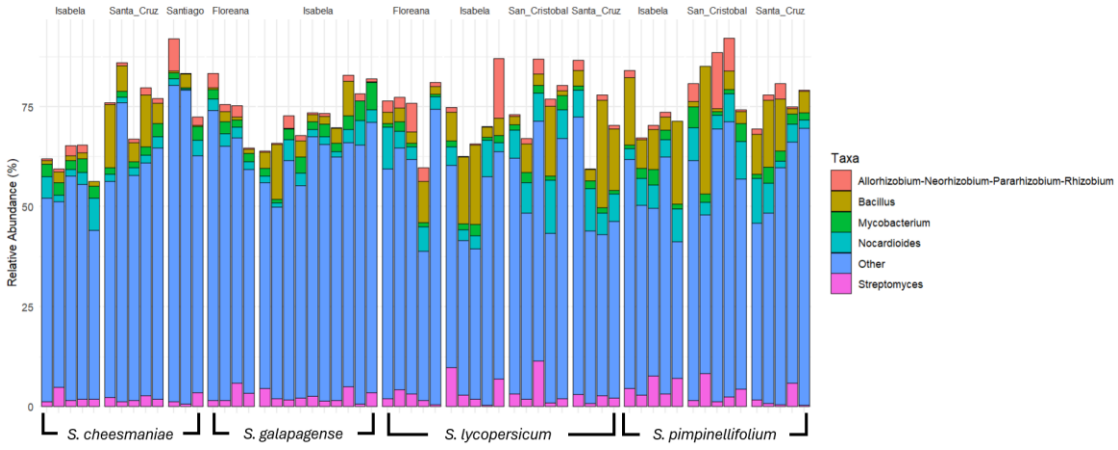


Figura 3. Abundancia relativa de los 5 géneros mas abundantes en la rizósfera

Descripción: Top 5 géneros más abundantes para las 4 especies de tomate analizadas, además de una categoría extra para los otros géneros restantes. Las muestras están clasificadas tanto por isla como por especie de *Solanum spp.* a la que corresponden.

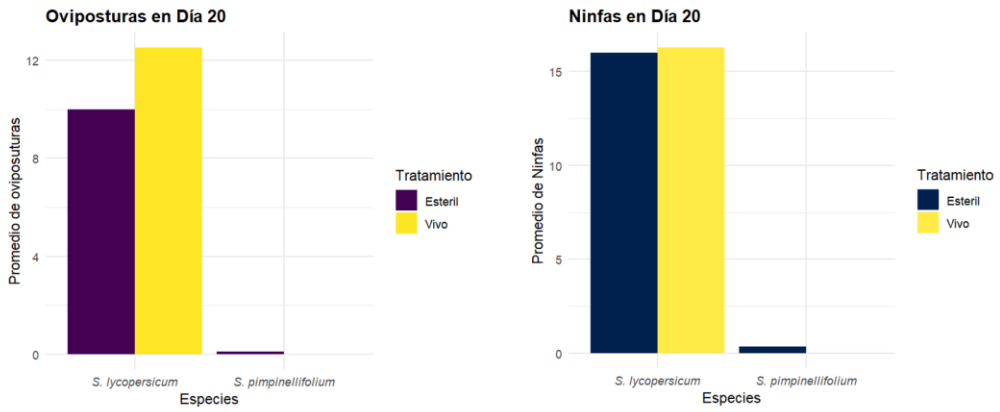


Figura 4. Cuantificación de infección por *B. cockerelli* al cabo de 20 días

Descripción: Número promedio de oviposturas y ninfas al cabo de 20 días como medida de infección por *B. cockerelli* en hojas de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* y variedad de tomate comercial *S. lycopersicum*. Los resultados denotan el efecto de la plaga en cada especie y en los tratamientos de suelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, *5*, 148.

Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2019). Ecology and evolution of plant microbiomes. *Annual review of microbiology*, *73*(1), 69-88.

Cordovez, V., Rotoni, C., Dini-Andreote, F., Oyserman, B., Carrión, V. J., & Raaijmakers, J. M. (2021). Successive plant growth amplifies genotype-specific assembly of the tomato rhizosphere microbiome. *Science of the Total Environment*, *772*, 144825.

Darwin, S. C., Knapp, S., & Peralta, I. E. (2003). Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of Solanum section Lycopersicon (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity*, *1*(1), 29-53.

Fan, W., Xiao, Y., Dong, J., Xing, J., Tang, F., & Shi, F. (2023). Variety-driven rhizosphere microbiome bestows differential salt tolerance to alfalfa for coping with salinity stress. Frontiers in Plant Science, 14, 1324333.

Sarango Flores, S. , Cordovez, V., Oyserman, B., Stopnisek, N., Raaijmakers, J. M., & van ‘t Hof, P. (2023). The tomato's tale: Exploring taxonomy, biogeography, domestication, and microbiome for enhanced resilience. *Phytobiomes Journal*, *8*(1), 5-20.

Gibson, M. J., de Lourdes Torres, M., & Moyle, L. C. (2020). Local extirpation is pervasive among historical populations of Galápagos endemic tomatoes. *Evolutionary Ecology*, *34*(2), 289-307.

Gutierrez, A., & Grillo, M. A. (2022). Effects of domestication on plant–microbiome interactions. *Plant and Cell Physiology*, *63*(11), 1654-1666.

Islam, M. R., Islam, R., Dutta, T., & Jhelom, F. R. (2023, October). Genetic and Microbial Insights into Drought Stress Alleviation in Tomato (Solanum lycopersicum L.). In *Biology and Life Sciences Forum* (Vol. 27, No. 1, p. 22). MDPI.

Karmakar, J., Goswami, S., Pramanik, K., Maiti, T. K., Kar, R. K., & Dey, N. (2021). Growth promoting properties of Mycobacterium and Bacillus on rice plants under induced drought. *Plant Science Today*, *8*(1), 49-57.

Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., & Singh, B. K. (2020). Microbiome-mediated stress resistance in plants. *Trends in plant science*, *25*(8), 733-743.

Ma, Y., Wang, J., Liu, Y., Wang, X., Zhang, B., Zhang, W., Chen, T., Liu, G., Xue, L., & Cui, X. (2023). *Nocardioides: "Specialists" for Hard-to-Degrade Pollutants in the Environment*. *Molecules*, 28(21), 7433. https://doi.org/10.3390/molecules28217433

Melgoza Villagómez, C. M., León Sicairos, C. D. R., López Valenzuela, J. Á., Hernández Espinal, L. A., Velarde Félix, S., & Garzón Tiznado, J. A. (2018). Presencia de Candidatus Liberibacter solanacearum en Bactericera cockerelli Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *9*(3), 499-509.

Mendes, L. W., Tsai, S. M., Navarrete, A. A., de Hollander, M., van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2015). Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. Microbial Ecology, 70(1), 255–265. doi:10.1007/s00248-014-0559-2

Pailles, Y., Ho, S., Pires, I. S., Tester, M., Negrão, S., & Schmöckel, S. M. (2017). Genetic diversity and population structure of two tomato species from the Galapagos Islands. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 138.

Pandey, S. N., Abid, M., & Abid Ali Khan, M. M. (2018). Diversity, functions, and stress responses of soil microorganisms. *Plant Microbiome: Stress Response*, 1-19.

Pantigoso, H. A., Newberger, D., & Vivanco, J. M. (2022). The rhizosphere microbiome: Plant–microbial interactions for resource acquisition. Journal of Applied Microbiology, 133(5), 2864-2876.

Raaijmakers, J. M., & Kiers, E. T. (2022). Rewilding plant microbiomes. *Science*, *378*(6620), 599-600.

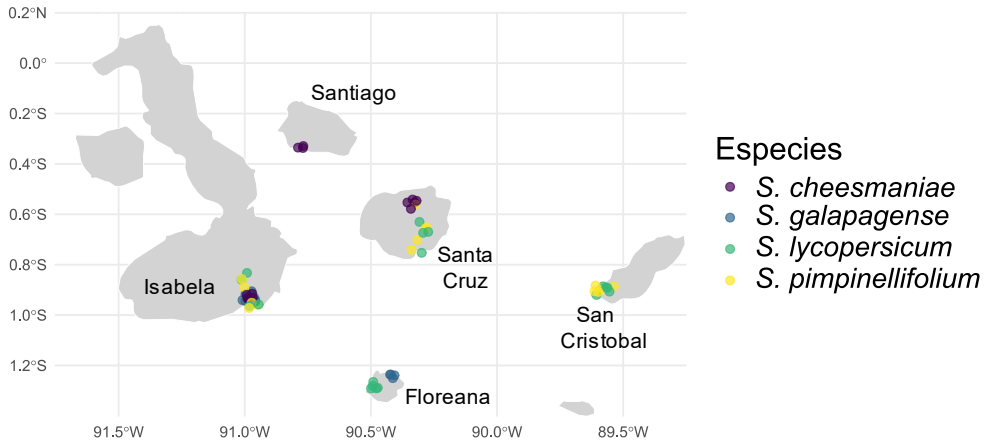
Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., ... & Caicedo, A. L. (2020). Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Molecular biology and evolution*, *37*(4), 1118-1132.

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5

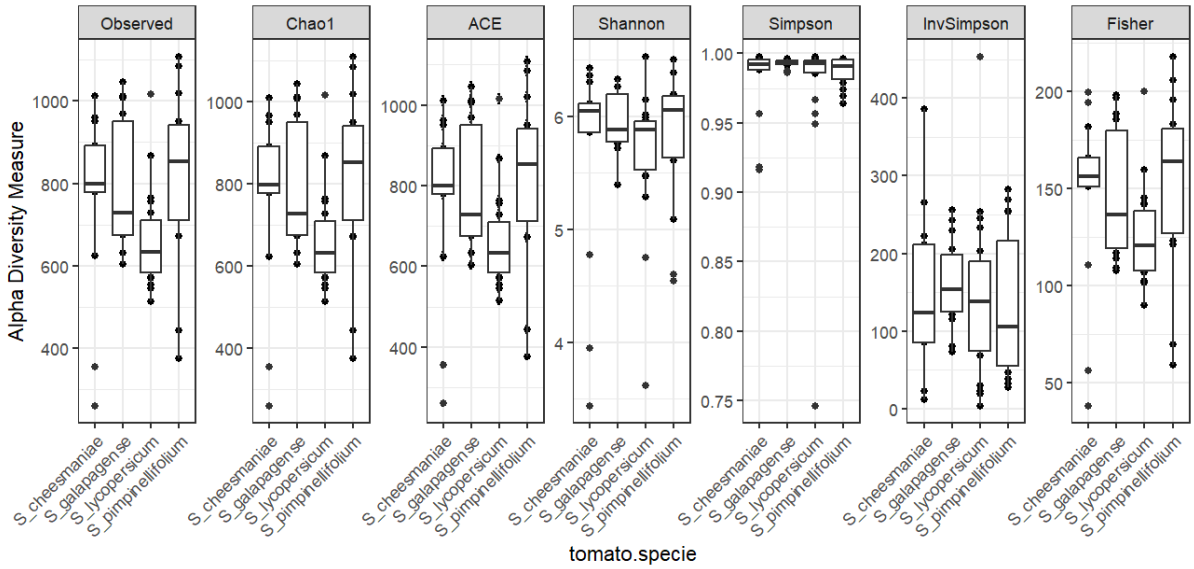
Wanner, L. A., Kirk, W. W. (2015). *Streptomyces – from Basic Microbiology to Role as a Plant Pathogen*. *American Journal of Potato Research*, 92, 236–242. https://doi.org/10.1007/s12230-015-9449-5

ANEXOS

ANEXO 1: PUNTOS DE MUESTREO EN LAS ISLAS GALAPAGOS



ANEXO 2: OVIPOSTURAS DE BACTERICERA COCKERELLI

ANEXO 3: NINFAS DE BACTERICERA COCKERELLI

ANEXO 4: COMPARACIÓN DE INDICES DE ALFA DIVERSIDAD