

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Exploración de bacterias asociadas al tomate
endémico *S. cheesmaniae* en las Islas Galápagos.**

Vanessa Micaela Salinas Tamayo

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 12 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

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

**Exploración de bacterias asociadas al tomate
endémico *S. cheesmaniae* en las Islas Galápagos.**

Vanessa Micaela Salinas Tamayo

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

Quito, 12 de mayo de 2025

© 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: Vanessa Micaela Salinas Tamayo

Código: 00323623

Cédula de identidad: 1721350062

Lugar y fecha: Quito, 12 de mayo de 2025

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

El microbioma rizosférico de plantas endémicas desempeña un papel clave en su adaptación y resiliencia ecológica. En este estudio, se investigó la diversidad bacteriana asociada a la rizósfera del tomate endémico *Solanum cheesmaniae* en tres islas del archipiélago de las Islas Galápagos: Fernandina, Isabela y Santa Cruz. Se estableció un biobanco bacteriano a partir del aislamiento de 46 diferentes morfotipos cultivables, clasificados mediante morfología macroscópica y basado en los resultados de la prueba de tinción de Gram, destacando una predominancia del género *Bacillus* Gram positivos en forma de bastón. El análisis metagenómico tipo *Shotgun* como técnica molecular no dependiente de cultivo reveló diferencias significativas en la composición microbiana completa de la rizosfera del tomate endémico. La diferencia del microbioma rizosférico en la isla Fernandina, al ser una isla no habitada y joven con géneros dominantes como *Streptomyces*, *Lentzea* y *Rubrobacter*, fue diferente de las otras dos islas. Además, se observó un enriquecimiento diferencial en la composición bacteriana en la rizosfera de *S. cheesmaniae*, en comparación con el suelo circundante, evidenciando una selección microbiana mediada por la planta bajo condiciones naturales. Estos hallazgos y el biobanco abren la posibilidad del screening del potencial funcional de bacterias asociadas al microbioma rizosférico del tomate endémico en ecosistemas insulares, con implicaciones en beneficio a su conservación y aplicación biotecnológica.

Palabras clave: Microbioma, Rizósfera, Tomate endémico, *Solanum cheesmaniae*,

Biobanco, Islas Galápagos

ABSTRACT

The rhizosphere microbiome of endemic plants plays a key role in their adaptation and ecological resilience. In this study, the bacterial diversity associated with the rhizosphere of the endemic tomato *Solanum cheesmaniae* was investigated on three islands of the Galapagos archipelago: Fernandina, Isabela and Santa Cruz. A bacterial biobank was established from the isolation of 46 different culturable morphotypes, classified by macroscopic morphology and based on the results of the Gram test, highlighting a predominance of the rod-shaped Gram-positive *Bacillus* genus. Shotgun metagenomic analysis provided a non-culture-dependent molecular technique which revealed significant differences in the overall microbial composition of the endemic tomato rhizosphere. The difference in the rhizosphere microbiome on Fernandina Island, being an uninhabited and young island with dominant genera such as *Streptomyces*, *Lentzea* and *Rubrobacter*, was different from the other two islands. Furthermore, a differential enrichment in bacterial composition was observed in the rhizosphere of collected *S. cheesmaniae* individuals, compared to the surrounding soil, evidencing plant-mediated microbial selection under natural conditions. Our findings and the established biobank open up the possibility of screening the functional potential of bacteria associated with the rhizosphere microbiome of the endemic tomato in the island ecosystem, with implications for the benefit of its conservation and future biotechnological application.

Key words: Microbiome, Rhizosphere, Endemic tomato, *Solanum cheesmaniae*, Biobanking, Galapagos Islands

TABLA DE CONTENIDOS

Introducción	11
Resultados	18
Discusión.....	21
Conclusiones	25
Tablas	26
Figuras.....	27
Referencias Bibliográficas	32
Anexos	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Morfotipos bacterianos Gram (+) y Gram (-) aislados por isla.....	26
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de colonias bacterianas por isla y tiempo de incubación.....	27
Figura 2. Abundancia relativa de los 10 géneros mas abundantes en la rizósfera.....	28
Figura 3. Análisis de beta diversidad (PCoA) entre pares de islas	29
Figura 4. Comparación de abundancia relativa entre suelo a granel y rizósfera por isla.	30
Figura 5. Análisis de beta diversidad (PCoA) por tipo de muestra	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Puntos de muestreo en las Islas Galapagos.....	37
---	----

INTRODUCCIÓN

El origen de las plantas terrestres fue posible gracias a relaciones de simbiosis microbiana, marcando una transición evolutiva clave que involucró microorganismos como los hongos micorrízicos arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* (Hartman et al., 2023). Estas interacciones simbióticas jugaron un papel fundamental en la adaptación y supervivencia de las plantas en condiciones edáficas limitantes, sentando las bases para la vasta diversidad vegetal que observamos hoy en día en el planeta. Algunas especies vegetales lograron colonizar amplios hábitats, mientras que otras coevolucionaron en nichos específicos. En las Islas Galápagos, por ejemplo, las especies endémicas de tomate *Solanum cheesmaniae* y *Solanum galapagense* han desarrollado adaptaciones específicas a su entorno, que favorecen su nutrición, resistencia a condiciones adversas y tolerancia al estrés ambiental (Gibson et al., 2021). No obstante, la alteración de estos ecosistemas, sumada a la introducción de especies invasoras representa una amenaza importante para su estabilidad ecológica.

Las Islas Galápagos son un archipiélago volcánico que se encuentra aproximadamente a 1000 km de la costa ecuatoriana. Sus islas se originaron por la actividad volcánica de una región de intenso calor en el manto terrestre, específicamente en la placa de Nazca, la cual se mueve en la dirección sureste, explicando el patrón de las Islas Galápagos con las islas más jóvenes en el Noroeste del archipiélago, mientras que las islas con mayor edad se encuentran situadas en el Sureste (Addison et al., 2013). Está compuesta por 13 islas principales, 5 islas pequeñas, más de 100 islotes y rocas. Posee variaciones influenciadas por su topografía, corrientes oceánicas y vientos. Desde enero a mayo predomina la temporada cálida y seca, mientras que de junio a diciembre mantiene temperatura fría con humedad (Fundación Charles Darwin, s.f.). Estas condiciones provocan llovizna en las zonas altas y dejan el resto del archipiélago casi seco, formando zonas climáticas distintas como áreas húmedas y secas con una zona intermedia (EOSEcuador, s.f.; Fundación Charles Darwin, s.f.). A partir de su formación, han sido

colonizadas por especies que llegaron por dispersión aérea, flotación marina o transporte por aves. Este aislamiento ha favorecido procesos de especiación y la aparición de especies endémicas con adaptaciones únicas (Hickman, 2009). Por ello, el archipiélago es considerado un laboratorio natural ideal para estudiar evolución, colonización biológica y selección natural, tal como lo observó Charles Darwin en su teoría (Salinas de León, 2020).

En las Islas Galápagos, existen dos especies endémicas de tomates: *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, y dos especies introducidas: el tomate silvestre nativo del sur de Ecuador, *S. pimpinellifolium*, y las variedades del tomate moderno cultivable *Solanum lycopersicum*. Las especies endémicas se han visto vulnerables debido a un alto potencial de desplazamiento o extinción ocasionado por desarrollo urbano, la expansión de especies invasivas dentro del Parque Nacional Galápagos y pérdida de integridad genética dada por la hibridación entre especies endémicas o nativas, e introducidas. La hibridación se da por el solapamiento de hábitat, morfología florar similar, y polinizadores compartidos entre especies endémicas e introducidas (Gibson et al., 2021). La IUCN ha designado a *S. cheesmaniae* como especie “*casi amenazada*” (NT), la cual representa un estado de conservación otorgado a una especie que según sus estándares globales se encuentren en una etapa antes del peligro de extinción en un futuro cercano (Charles Darwin Foundation, 2025).

S. cheesmaniae se ha adaptado a entornos hostiles como suelos áridos, volcánicos, rocosos y salados y habitan en rango altitudinal de aproximadamente 5-1478 msnm a una temperatura entre 17.1-25 °C (Pailles et al., 2020). Es por esto que se destacan como una fuente valiosa de variación genética enfocada a tolerancia a estrés (a)biótico (Ramírez et al., 2021). Sin embargo, varias investigaciones se han centrado en la evolución y genética de la planta, por lo cual surge un nuevo enfoque hacia el microbioma asociado a la planta, ya que se ha evidenciado que brinda efectos positivos en el crecimiento, desarrollo y salud de la planta (Flores et al., 2023). El término microbioma se refiere a las comunidades de microorganismos (bacterias, hongos,

arqueas, virus, entre otros) que habitan un entorno específico, junto con sus genomas, metabolitos y las interacciones que establecen entre sí en un entorno específico (Berg et al., 2020). En plantas, el microbioma es moldado por la liberación de exudados radiculares que moldean la estructura de las comunidades microbianas en la rizósfera, una zona del suelo directamente influenciada por las raíces, que contiene una actividad microbiana mucho más alta que el suelo circundante (Berendsen et al., 2012; Philippot et al., 2013). Los microorganismos en el suelo muestran relaciones interdependientes con la planta. Promueven el crecimiento vegetal con la producción de fitohormonas como auxinas, citoquininas, reguladores del crecimiento vegetal, compuestos antimicrobianos y sideróforos para incrementar la disponibilidad de nutrientes (Chen, et al. 2022).

En este contexto, se establecen relaciones mutualistas entre micro-simbiontes, como las bacterias fijadoras de nitrógeno (por ejemplo, *Rhizobium*) y los hongos formadores de micorrizas arbusculares, que proporcionan nutrientes a la planta a cambio de compuestos carbonados sintetizados por su proceso de fotosíntesis (Smith & Read, 2008). La comparación entre el microbioma de la rizósfera y el suelo circundante es interesante porque podría revelar si la rizósfera alberga comunidades microbianas más especializadas, adaptadas a las señales químicas de las raíces, mientras que el suelo circundante actúa como un reservorio microbiano más generalista (Fierer, 2017). Esta interacción planta-microbioma representa un sistema interdependiente que es clave para aplicaciones agrícolas, mediante cultivos asistidos con microbiomas especializados a fenotipos vegetales deseados (Raaijmakers & Kiers, 2022).

Bajo esta perspectiva, el microbioma es un reservorio de microorganismos con funciones clave para la supervivencia y adaptación de las plantas. Razón por la cual generar un repositorio de estos microorganismos permitiría su preservación y almacenamiento enfocadas a la investigación con el fin de poder caracterizarlas para descubrir su posible funcionalidad o

aplicación en la conservación, manejo de recursos genéticos y uso eficiente de fuentes biológicas (Galapagos Science Center, 2022).

En este sentido, la presente investigación se propone explorar las bacterias que conforman el microbioma de la rizósfera de *Solanum cheesmaniae* en poblaciones naturales en varias islas Galápagos. En primer lugar, se busca caracterizar las bacterias cultivables de la rizósfera, mediante la creación de un biobanco de cepas bacterianas, identificando sus morfologías, contando las colonias y clasificándolas mediante tinción de Gram, lo que ofrece una primera aproximación a la diversidad microbiana presente. En segundo lugar, se busca determinar la variación en la composición microbiana rizosférica de *S. cheesmaniae* entre individuos muestreados en las islas Fernandina, Isabela y Santa Cruz, considerando posibles influencias ambientales y geográficas.

Finalmente, se compara el microbioma de la rizosfera con el del suelo circundante con el fin de evaluar la influencia de las raíces sobre la estructura microbiana del suelo e identificar un posible enriquecimiento microbiano mediado por la planta huésped. Para los dos últimos objetivos, se utiliza secuencias generadas mediante Shotgun metagenomics para analizar la beta diversidad para identificar posibles diferencias significativas entre la composición del microbioma, así como las abundancias relativas para reconocer los diversos grupos taxonómicos e.g. género de bacterias predominantes y relacionarlo con posibles efectos funcionales en la planta.

MÉTODOS

2.1 Recolección de muestras en campo en las Islas Galápagos

Se recolectaron muestras del tomate *S. cheesmaniae* de poblaciones naturales de las islas Fernandina, Isabela y Santa Cruz en las Islas Galápagos en mayo del 2024 (**Anexo 1**). Se muestreó la rizósfera y el suelo circundante de 21 individuos. Para las muestras de rizósfera se recolectaron raíces de aproximadamente 10 cm con suelo adherido y se las colocaron en 5 ml de la solución de DNA/RNA Shield (Zymo Research, USA) con glicerol al 40%. La misma solución se utilizó para las muestras de suelo circundante. Todas las muestras se almacenaron en coolers con icepacks en el campo refrigeradas a 4°C de noche. Todas muestras fueron transportados a los laboratorio de la Universidad San Francisco de Quito en Quito donde se almacenaron a -20°C

2.2 Creación de Biobanco de bacterias

Se prepararon medios de cultivo sólido TSA (Tryptic Soy Agar) al 10%, suplementado con 50 mg/L de natamicina, un antifúngico utilizado para inhibir el crecimiento de hongos, los cuales fueron esterilizados en autoclave por 20 minutos a 121 °C. Estos medios fueron dispensados en cajas Petri estériles bajo condiciones asépticas. Para la preparación de las diluciones, se colocaron 900 µL de agua peptonada estéril en tubos de ensayo y se añadieron 100 µL de la muestra de rizosfera, obteniendo diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se sembraron dos diluciones por cada muestra, las cuales fueron seleccionadas en función de la densidad esperada de microorganismos. Las placas fueron incubadas durante 72 horas a 37.5 °C. El crecimiento microbiano fue evaluado mediante conteos a las 24, 48 y 72 horas post-siembra. Las colonias con morfologías distintas fueron seleccionadas en base a diferencias de color, textura y forma, y resembradas. Este proceso se realizó tomando una colonia con un palillo estéril y colocándola en nuevas cajas petri con medio de TSA, esparcidas con un cotonete estéril y estriadas. Estas

colonias aisladas fueron mantenidas en incubación por 24 h. Este procedimiento se replicó para un total de 15 muestras de rizósfera, cinco muestras de cada isla muestreada. Finalmente, los aislamientos puros fueron preservados en crioviales con 600 μ L de glicerol al 40% y 900 μ L de medio TSB (Tryptic Soy Broth). Las muestras fueron almacenadas en congelación para su conservación a largo plazo, archivadas en el biobanco en las neveras de la USFQ.

2.3 Caracterización bacterias con la prueba de tinción Gram

Para la tinción de Gram, se preparó un frotis bacteriano con solución salinas sobre un portaobjetos, el cual se dejó secar al aire y se fijó mediante calor. Posteriormente, se aplicó cristal violeta durante un minuto como colorante primario, seguido de un enjuague suave con agua destilada. Luego se añadió lugol como mordiente durante un minuto, y se enjuagó nuevamente. El frotis fue decolorado con alcohol-acetona durante 5 a 10 segundos y se enjuagó inmediatamente con agua para detener la acción del decolorante. Finalmente, se aplicó safranina como colorante de contraste durante un minuto, se enjuagó con agua y se dejó secar al aire. La observación se realizó al microscopio óptico con aceite de inmersión con el objetivo 100x.

2.4 Extracción de ADN y secuenciamiento metagenómico

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del Instituto de Microbiología de la USFQ en el campus en Cumbayá. Se sometieron las muestras en el vortex por dos minutos con el fin de liberar el suelo adherido. Posteriormente, las raíces se separaron en otros tubos con solución PBS. El ADN total de las muestras de rizósfera y del suelo circundante se extrajo el con el kit “ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit” (Zymo Research Corp., USA), de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las muestras liofilizadas fueron enviadas a Zymo Research para secuenciar el ADN total mediante metagenómica Shotgun de ZymoBIOMICS utilizando la plataforma NovaSeqTM 6000 de Illumina (Zymo Research Corp., USA). Las lecturas crudas

obtenidas fueron recortadas utilizando Trimmomatic 0.33 lo que removió las fracciones con baja calidad y los adaptadores moleculares (Bolger et al., 2014). Asimismo, se utilizó el sistema *Centrifuge* para la clasificación de los microorganismos a partir de las secuencias metagenómicas (Kim, et al., 2016).

2.5 Análisis bioinformático

A partir del secuenciamiento metagenómico, se utilizó R studio con el paquete de Phyloseq para generar gráficas de la abundancia relativa de las bacterias, comparando la rizósfera y con el suelo circundante de individuos de *S. cheesmaniae* muestreadas en poblaciones naturales de las tres islas. De igual manera, se evaluó la beta diversidad mediante una matriz de distancia Bray-Curtis, su significancia se evaluó con PERMANOVA con un valor p de 0.05 con R studio. La beta diversidad comparó la composición del microbioma entre islas y diferenciando entre rizósfera y suelo circundante de cada isla.

RESULTADOS

3.1 Aislamiento y creación biobanco de bacterias de la rizosfera de *S. cheesmaniae*

Se presenta el número de colonias bacterianas aisladas de la rizosfera de *S. cheesmaniae* en tres islas del archipiélago: Fernandina, Isabela y Santa Cruz, tras un conteo en 24, 48 y 72 horas (**Figura 1**). Se observa que Isabela presentó la mayor riqueza microbiana, con un número de colonias más alto (157), mientras que Santa Cruz muestra la menor. Por su parte, Fernandina exhibe un patrón de crecimiento escalonado y progresivo a lo largo del tiempo. En todas las islas, la mayor parte del crecimiento microbiano ocurre entre las 24 y 72 horas, con un número similar de colonias en ambos períodos. Sin embargo, a las 48 horas se observa una disminución relativa del crecimiento en Isabela y Santa Cruz, mientras que en Fernandina aumenta.

3.2 Agrupación bacterias candidatas del biobanco mediante la prueba de tinción Gram

Con el fin de poder agrupar las bacterias candidatas representando los 46 diferentes morfotipos del *screening* original, se ejecutó una prueba de tinción de Gram para poder mejorar las observaciones microscópicas para poder clasificar la morfología de cada colonia respecto a la forma y el color de la colonia después del contacto con la solución de la tinción Gram. Los resultados de esta prueba, cuales se detallan en la **Tabla 1**, clasificando un grupo de 27 bacterias candidatas que correspondieron a bacterias Gram positivas, y otro grupo de 19 candidatas de bacterias Gram negativas. Basándonos en la forma de las bacterias, se pudo observar una predominancia de la morfología bacilar en ambos grupos. La mayor riqueza morfotípica se registró en Santa Cruz, con un total de 18 morfotipos, seguida por Fernandina e Isabela, cada una con 14 distintos morfotipos. Es interesante mencionar que en Santa Cruz se observaron tanto bacilos Gram positivos como negativos, y Santa Cruz fue la única isla con una presencia exclusiva de cocos Gram positivos.

3.3 Identificación molecular de bacterias asociadas a la rizosfera de *S. cheesmaniae*.

3.3.1. Composición bacteriana de la rizosfera de *S. cheesmaniae* entre islas.

Con el fin de poder identificar las bacterias asociadas a la rizósfera de individuos del tomate endémico *S. cheesmaniae* en su entorno natural de poblaciones existentes en las islas Fernandina, Isabela, y Santa Cruz, sin depender de la posibilidad de cultivarlas en cajas Petri, ejecutamos un análisis molecular a partir del secuenciamiento metagenómico de las muestras.

En cuanto a la composición del microbioma de la rizosfera de *S. cheesmaniae* entre islas, el análisis de abundancia relativa (**Figura 2**) del microbioma reveló una composición bacteriana dominada por los géneros *Streptomyces*: 19% en Fernandina y 14.5% en Isabela, *Lentzea*: 11.8% en Fernandina y 19.5% en Isabela, y *Rubrobacter*: 21.6% en Santa Cruz. Esto demuestra que la distribución de estos géneros varió entre islas.

Para evaluar la diversidad beta (**Figura 3**), se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en distancias de Bray-Curtis. Este análisis mostró una clara separación de las comunidades bacterianas entre islas, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.001$) basado en un análisis de PERMANOVA. Los puntos correspondientes a las muestras de Fernandina se agruparon de manera distinta respecto a los de Isabela y Santa Cruz. De forma más específica se realiza una comparación por pares de cada isla en la que Fernandina se muestra diferencia significativa con Santa Cruz con un valor p de 0.001 y con Isabela con $p=0.003$.

3.3.2. Enriquecimiento bacteriano diferencial de la rizosfera de *S. cheesmaniae*

Comparando el microbioma de *S. cheesmaniae* entre la rizósfera y suelo circundante, la abundancia relativa (**Figura 4**) muestra un patrón repetido en el incremento de géneros como *Streptomyces* y *Lentzea*. En contraste, el género *Solirubrobacter*, *Reyranella* y *QHZN01* (de la familia *Pyrinomonadaceae*) mostró una reducción en la rizósfera, indicando que su presencia

está más asociada al suelo circundante. Asimismo, la comparación entre la composición microbiana entre rizósfera y suelo circundante evaluada por análisis PCoA sugiere una diferencia estadísticamente significativa entre las comunidades bacterianas de la rizósfera y las del suelo circundante ($p = 0.002$), ver *Figura 5*.

DISCUSIÓN

El número y el patrón de crecimiento de las colonias bacterianas en la rizosfera de *S. cheesmaniae* difirieron entre las islas Fernandina, Isabela y Santa Cruz) (Figura 1), lo que sugiere variaciones en la riqueza microbiana asociada al suelo y/o al microclima local. Isabela presentó la mayor cantidad de colonias, posiblemente debido a una mayor disponibilidad de nutrientes (Philippot et al., 2013), mientras que Santa Cruz mostró la menor, probablemente por suelos pobres en materia orgánica o mayor presión antrópica, factores que reducen la diversidad microbiana (Van der Heijden et al., 2008). El crecimiento progresivo observado en Fernandina podría reflejar una comunidad especializada y adaptada a las condiciones extremas de esta isla joven y volcánica (Hadland et al., 2024).

Se asilaron 46 morfotipos bacterianos con base en características fenotípicas macroscópicas, aún útiles ante la falta de herramientas moleculares (Madigan et al., 2019). La creación del primer biobanco rizosférico en este hábitat extremo ofrece una base para investigaciones funcionales y taxonómicas futuras. La mayoría de los morfotipos aislados fueron Gram positivos (n=27), principalmente bacilos, lo cual concuerda con su prevalencia en suelos extremos. Actinomycetota, especialmente, muestra adaptaciones como esporulación y producción de metabolitos secundarios especializados a defensa biótica como antibióticos y toxinas (Carrol et al., 2016; Ventura et al., 2007).

A pesar de que el aislamiento y cultivo bacteriano permite obtener un biobanco representativo una fracción de la comunidad bacteriana de la rizosfera de *S. cheesmaniae*, se reconoce que solo una pequeña proporción del total de las bacterias es cultivable. Esta limitación destaca la importancia de implementar técnicas moleculares como de secuenciación y metagenómica con el fin de acceder a una perspectiva más completa de la composición de la comunidad bacteriana (Kapinusova et al., 2023).

Los análisis de abundancia relativa una diferencia significativa en la composición del bacterioma rizosférico de *Solanum cheesmaniae* de las tres islas. La mayoría de los géneros más abundantes pertenecen al filo Actinomycetota, incluyendo *Streptomyces*, *Lentzea*, *Pseudonocardia*, *Nocardoides*, *Microbacterium* y *Amycolatopsis* (Figura 2) conocidos por su tolerancia a suelos extremos, producción de metabolitos secundarios y beneficios a plantas hospedadoras (Ventura et al., 2007). La composición microbiana está determinada por múltiples factores, incluyendo la fertilidad del suelo, el clima, la geografía y la actividad humana. En este caso, la alta abundancia de *Actinomycetota* podría estar relacionada con el estado fisiológico de maduración de las plantas, etapa en la que este filo suele ser más frecuente (Ajilogba et al., 2022).

Por otro lado, los géneros restantes corresponden a miembros del filo *Pseudomonadota*, como *Bradyrhizobium* y *Sphingobium*, los cuales están comúnmente asociados a procesos benéficos como la fijación de nitrógeno biológico, desnitrificación, degradación de compuestos orgánicos complejos y promoción del crecimiento vegetal (Jones et al., 2016; Boss et al. 2022).

La dominancia de los géneros *Streptomyces*, *Lentzea* y *Rubrobacter* es variable entre islas, lo que sugiere una selección positiva relacionada con sus funciones de promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a estrés. *Streptomyces* representó el 19% en Fernandina y el 14.5% en Isabela; su capacidad para producir antibióticos, sideróforos y fitohormonas podría ser ventajosa para contrarrestar fitopatógenos en suelos volcánicos jóvenes y pobres en materia orgánica (Hu et al., 2020). Por su parte, la mayor proporción de *Lentzea* (19.5%) en Isabela, indica la presencia de microorganismos capaces de sintetizar compuestos bioactivos con actividad antibacteriana, antifúngica y sideróforos, que se relacionan con resistencia a estrés biótico y abiótico (Maiti & Mandal, 2022). En Santa Cruz predominó *Rubrobacter* (21.6%), género característico de ecosistemas extremos por su alta tolerancia a la radiación ionizante y la desecación; además puede favorecer a la planta mediante la tolerancia a estrés abiótico,

promoción del crecimiento en ambientes áridos, y el ciclaje de azufre, nitrógeno y fosfato en el suelo (Chen et al., 2021). Esta isla, al presentar condiciones más alteradas por el impacto humano, podría favorecer géneros que contribuyen a la resiliencia del sistema vegetal ante perturbaciones.

Las comparaciones entre islas revelan diferencias significativas en la composición microbiana entre Fernandina y las islas Isabela y Santa Cruz, lo que refleja la influencia de factores geográficos, edáficos y adaptativos. En particular, la juventud geológica de Fernandina y sus ecosistemas volcánicos extremos favorecen comunidades bacterianas especializadas, adaptadas a suelos poco desarrollados y con baja disponibilidad de nutrientes (Hadland et al., 2024). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de Isabela y Santa Cruz, lo que sugiere una posible convergencia microbiana, probablemente asociada a condiciones ambientales similares o al impacto de la actividad humana.

La comparación entre la rizosfera y el suelo circundante provenientes de una misma área es fundamental para la comprensión de las interacciones de las plantas con el suelo, el ciclo de nutrientes y la dinámica microbiana. La rizosfera es la zona en contacto directo con la raíz de la planta y es influenciada por exudados radiculares, alterando las condiciones físicas, químicas y biológicas, mientras que el suelo circundante no es moldeado por la actividad radicular. Analizar ambas zonas permite revelar cómo las raíces influyen en su entorno más cercano y que efecto tienen esos cambios en el desarrollo y bienestar de la planta. Los resultados indican que el microbioma de la rizosfera de *S. cheesmaniae* se distingue significativamente del microbioma del suelo circundante, como lo demuestra el análisis de diversidad beta (**Figura 3**) y la abundancia relativa de géneros bacterianos (**Figura 2**). Esta diferencia respalda que las raíces de *S. cheesmaniae* ejercen una presión selectiva sobre ciertas comunidades microbianas mediante liberación de exudados radiculares. Esto altera el entorno físico, químico y biológico

de la rizosfera favoreciendo la colonización de microorganismos funcionales que se adaptan e interactúan de acuerdo a las necesidades del tomate bajo condiciones adversas en las Islas Galápagos (Philippot et al., 2013; Garcia et al., 2022).

Los géneros como *Streptomyces* y *Lentzea* exhiben una mayor abundancia en la rizosfera lo cual podría atribuirse a sus propiedades beneficiosas para la planta. En contraste, los géneros *Reyranella* y *QHZN01* muestran mayor abundancia en el suelo circundante, indicando que su presencia no está directamente estimulada por exudados radiculares o condiciones específicas de la rizosfera (Philippot et al., 2013). Dicho genero QHZN01 pertenece a la familia *Pyrinomonadaceae*, fue recién descrita en muestras de hábitats volcánicas en Nueva Zelanda (Wust et al., 2016). La reducción de géneros como *Reyranella* y *Solirubrobacter* en la rizosfera brinda una idea de que sus funciones podrían estar relacionadas con el ciclado de materia, asimilación de materia orgánica, ciclaje biogeoquímico, desnitrificación más que una interacción con la planta (Jiang et al., 2023; Duan et al., 2023)

La integración de métodos de cultivo y metagenómica permitió caracterizar de forma complementaria el bacterioma rizosférico de *S. cheesmaniae*. Mientras el biobanco conserva géneros cultivables como *Streptomyces*, la metagenómica detectó taxones de difícil cultivo como *Rubrobacter* y *QHZN01*, detectados únicamente a nivel de ADN por sus exigencias nutricionales o tolerancia a condiciones extremas, lo que dificulta su crecimiento en laboratorio (Holmes et al., 2000). En conjunto, ambos enfoques proporcionan un panorama más completo y sientan las bases para estudios funcionales orientados a la conservación y al aprovechamiento biotecnológico de los microbios asociados al tomate endémico de Galápagos (Liu et al., 2022).

CONCLUSIONES

Este estudio investigó el microbioma rizosférico asociado al tomate endémico *S. cheesmaniae* en su hábitat natural en las Galápagos a través de técnicas microbiológicas y metagenómica. Se aislaron y caracterizaron 46 diferentes morfotipos bacterianos, clasificados en 27 Gram positivos y 19 Gram negativos, predominando la morfología bacilar en ambos grupos. Estos aislamientos fueron conservados en un biobanco con fines de caracterización funcional futura. El análisis de colonias cultivables mostró que Isabela presentó la mayor riqueza bacteriana, mientras que Santa Cruz tuvo la menor.

Para acceder a la información genética de bacterias no-cultivables, se ejecutó un análisis metagenómico, que reveló que la composición bacteriana asociada a las raíces de *S. cheesmaniae* en la isla Fernandina fue significativamente distinta respecto a muestras de las otras islas posiblemente a su juventud geológica y bajo impacto humano. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre la rizósfera y el suelo circundante, lo que indica una selección específica de la planta sobre su microbioma. Géneros como *Streptomyces*, *Lentzea* y *Rubrobacter* dominaron en la rizósfera, conocidos por su capacidad de producir metabolitos bioactivos, compuestos antimicrobianos y fitohormonas, sugiriendo un rol funcional en la adaptación al estrés ambiental dentro de la relación tomate-microbioma. En contraste, *Reyranella* y *QHZN01* fueron más abundantes en el suelo, relacionándose a ciclaje de nutrientes más que a interacción directa con la planta.

Estas asociaciones específicas podrían ser clave para la resiliencia de especies amenazadas como *S. cheesmaniae*, y ofrecen nuevas oportunidades para su conservación. El biobanco generado constituye un recurso valioso para futuras investigaciones sobre funciones bacterianas, bioinsumos agrícolas y aplicaciones ecológicas. Por último, se plantea avanzar en la identificación molecular, análisis funcional y bioensayos aplicados a tolerancia a estrés.

TABLAS

Tabla 1. Morfotipos bacterianos Gram (+) y Gram (–) aislados por isla

Isla	Fernandina	Isabela	Santa Cruz	Total
Gram +	6	11	10	27
Bacilos	5	8	10	23
Cocos	1	3	0	4
Cocobacilos	0	0	0	0
Gram -	8	3	8	19
Bacilos	7	2	7	16
Cocos	0	1	0	1
Cocobacilos	1	0	0	1
Total	14	14	18	46

Descripción: La tabla muestra 46 aislamientos bacterianos de la rizosfera de *Solanum cheesmaniae* en tres islas. Predominan las bacterias Gram positivas (27), especialmente bacilos. Santa Cruz presentó el mayor número total de aislamientos (18), mientras que Isabela tuvo más Gram positivas.

FIGURAS

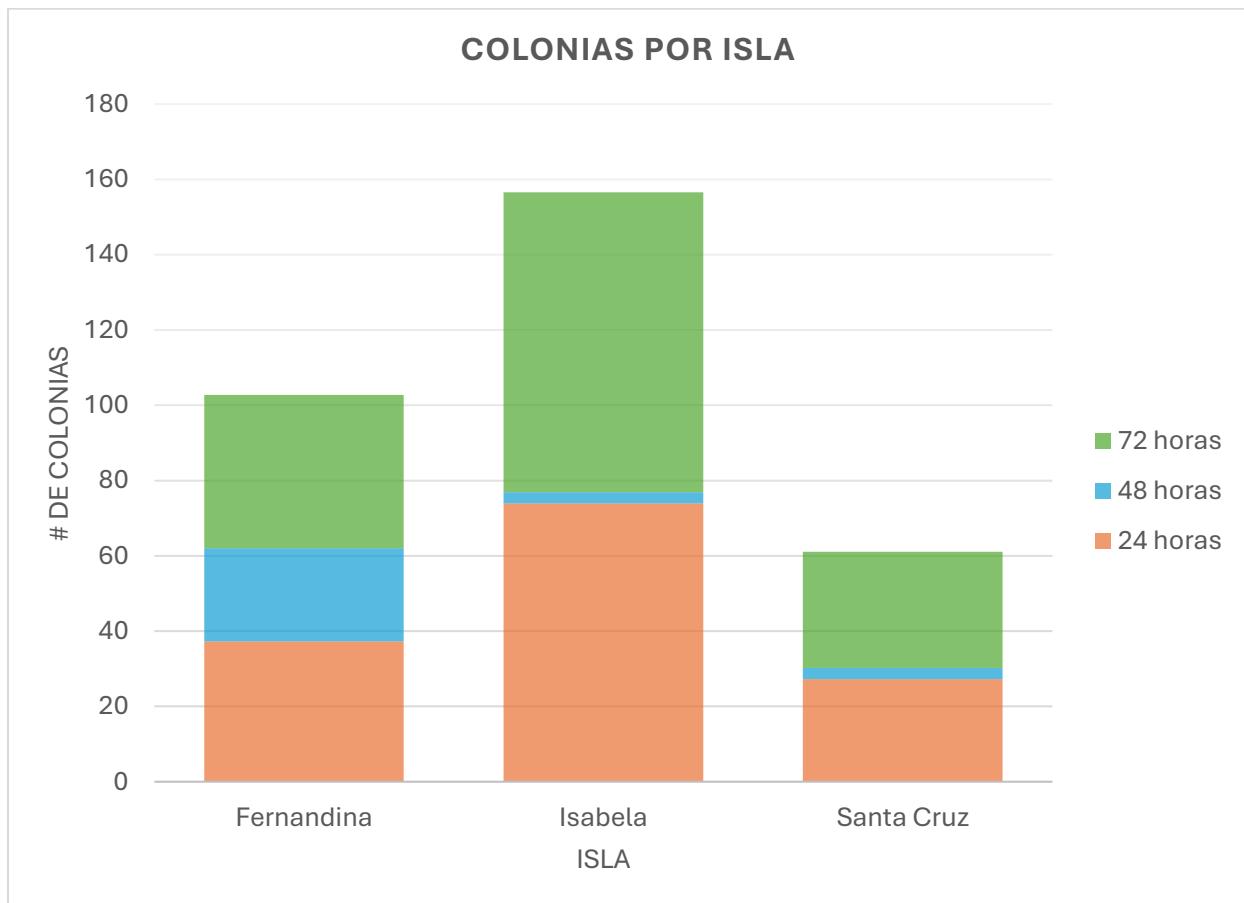


Figura 1. Número de colonias bacterianas por isla y tiempo de incubación

Descripción: Gráfico de barras apiladas que muestra el número total de colonias bacterianas aisladas en Fernandina, Isabela y Santa Cruz a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Isabela presentó la mayor riqueza microbiana, seguida de Fernandina y Santa Cruz.

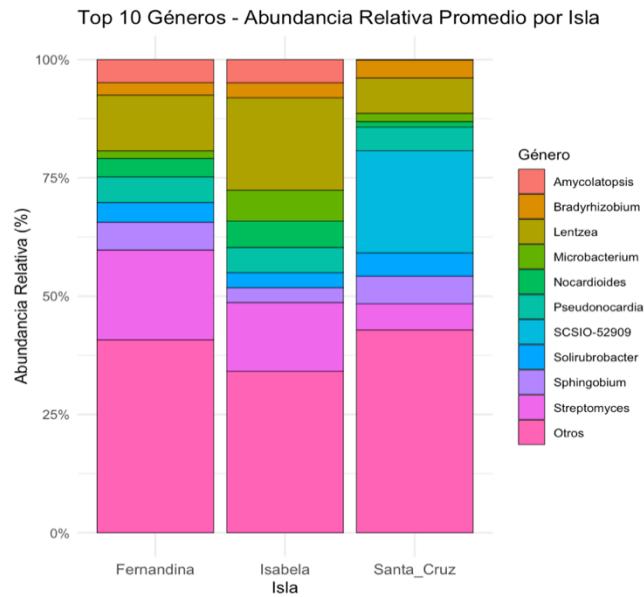


Figura 2. Abundancia relativa de los 10 géneros más abundantes en la rizósfera

Descripción: Se presenta la abundancia relativa de los 10 géneros bacterianos más abundantes en cada isla y una categoría que englobe los otros géneros. La distribución revela diferencias en la estructura de la comunidad microbiana entre Fernandina, Isabela y Santa Cruz.

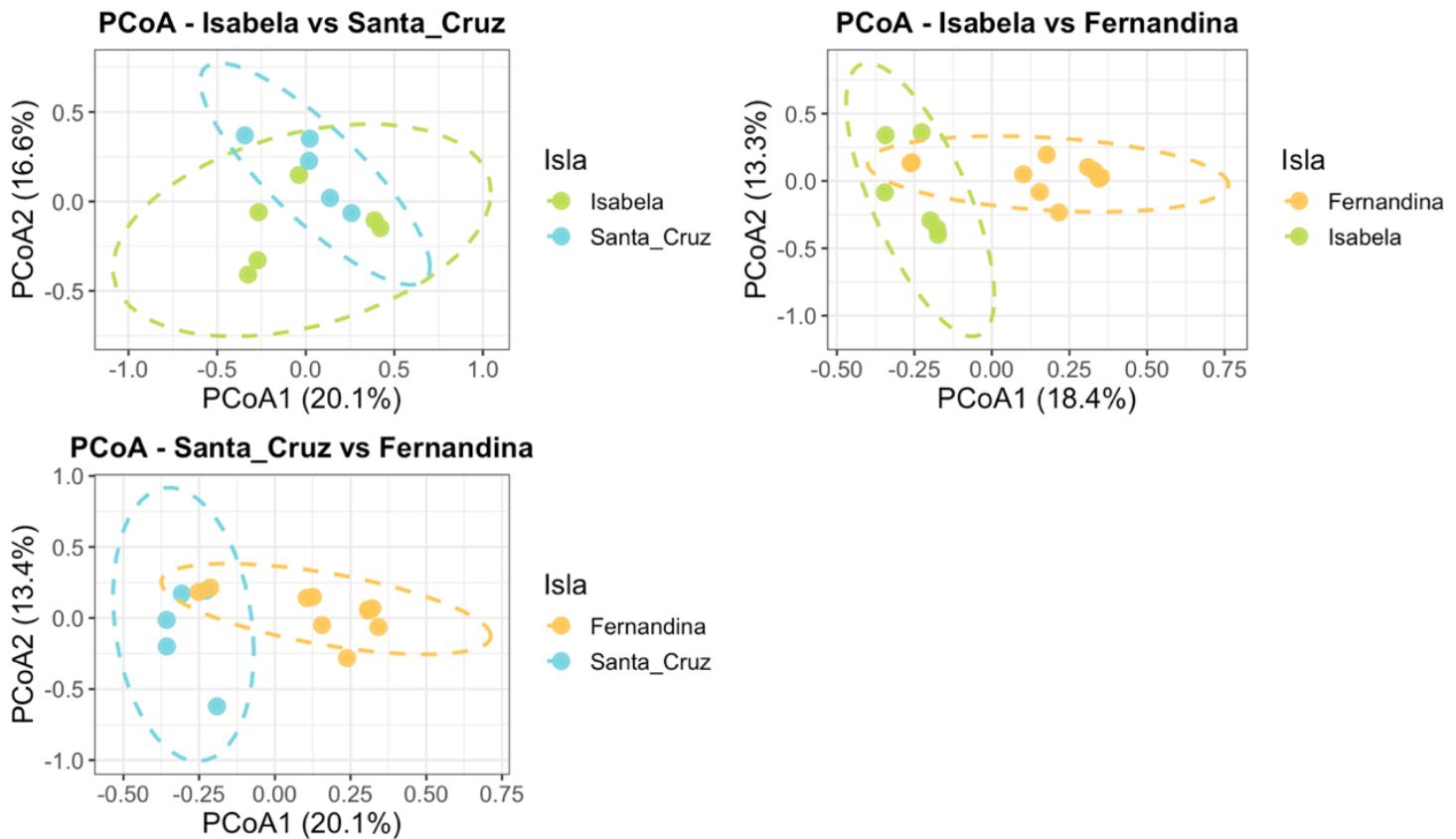


Figura 3. Análisis de beta diversidad (PCoA) entre pares de islas

Descripción: Se presentan tres gráficas del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basadas en distancias Bray-Curtis que representan la disimilitud en la composición de comunidades bacterianas entre pares de islas. Las agrupaciones por isla sugieren patrones diferenciados de beta diversidad según la ubicación geográfica.

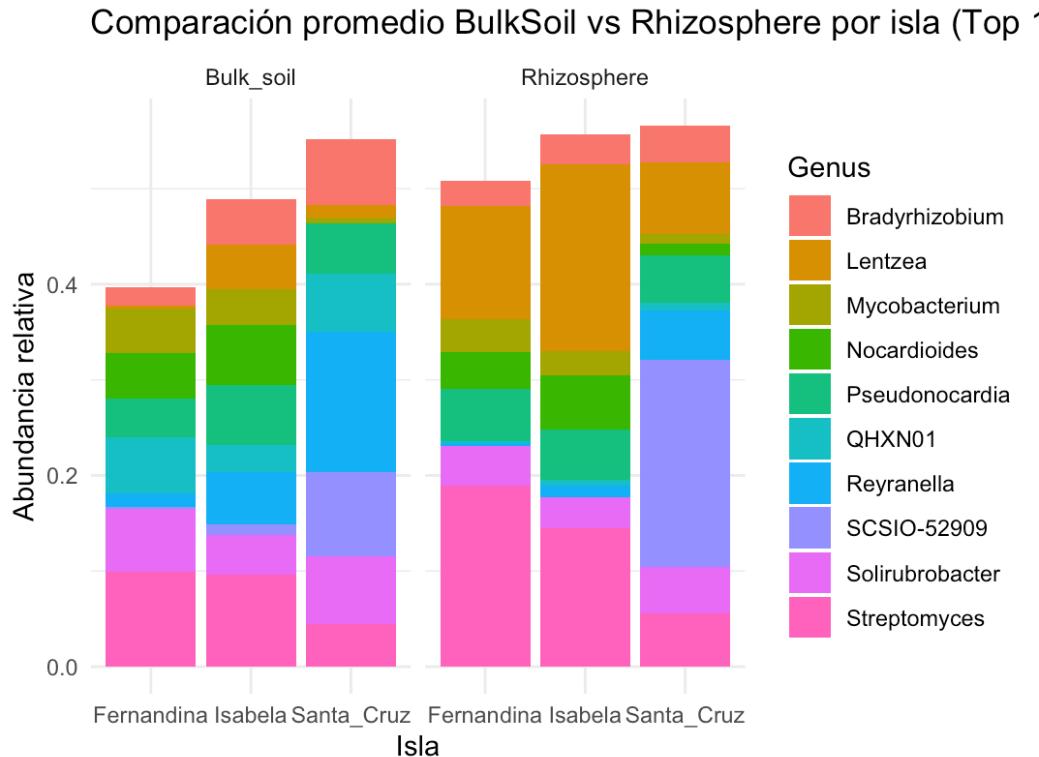


Figura 4. Comparación de abundancia relativa entre suelo a granel y rizósfera por isla.

Descripción: Se muestra la abundancia relativa promedio de los principales géneros bacterianos en muestras de suelo circundante y rizósfera provenientes de las islas Fernandina, Isabela y Santa Cruz. Se observa una variación en la composición microbiana según el tipo de muestra y la isla de origen.

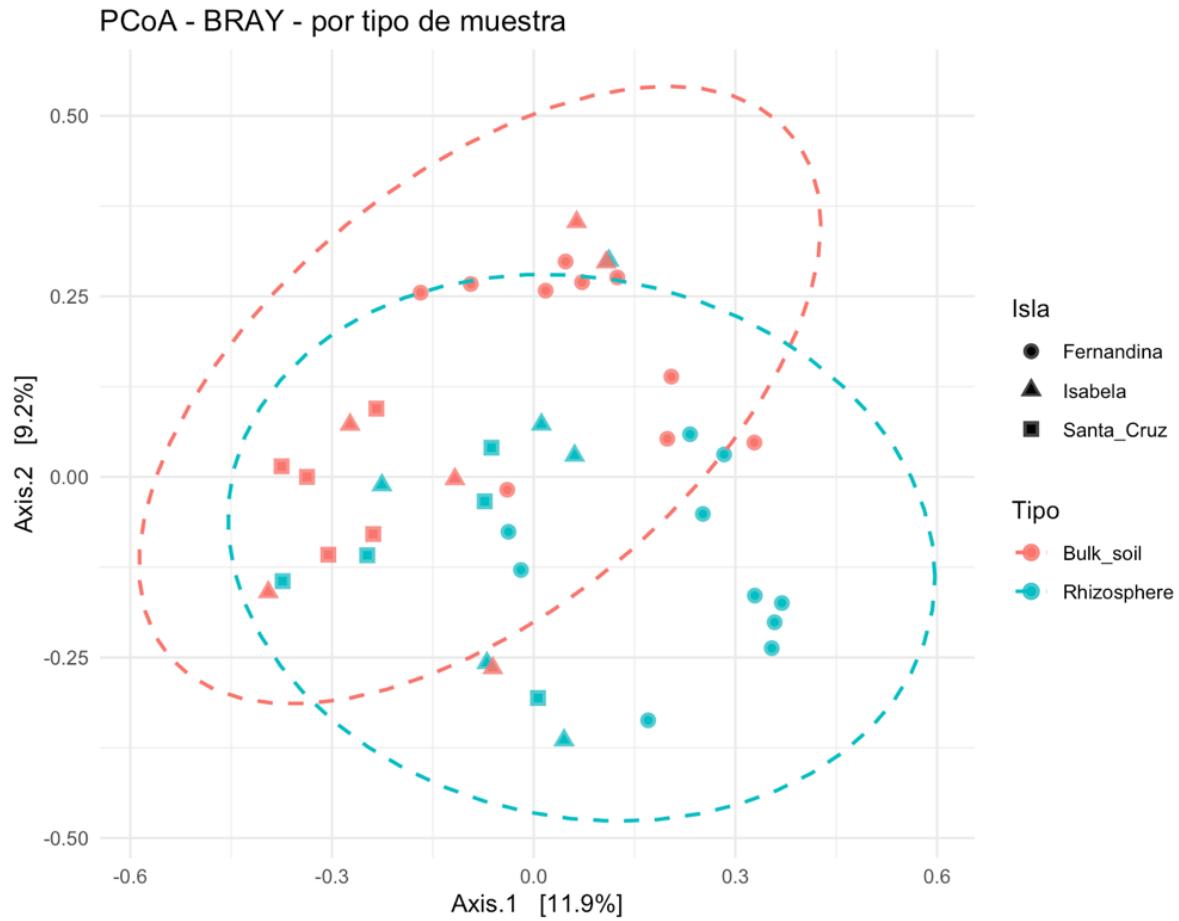


Figura 5. Análisis de beta diversidad (PCoA) por tipo de muestra

Descripción: Se observa un gráfico de PCoA que compara la beta diversidad microbiana entre muestras de suelo circundante y rizósfera. Las elipses indican la separación en la composición microbiana entre ambos tipos de muestra, basada en distancias Bray-Curtis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addison, A., Toulkeridis, T., Taylor, S., Osburn, G., Hoese, G., & Delgado, V. (2013, July). Recent investigations in the Galápagos Islands, Ecuador. In *16th International Congress of Speleology*.
- Ajilogba, C. F., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2022). Plant growth stage drives the temporal and spatial dynamics of the bacterial microbiome in the rhizosphere of *Vigna subterranea*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 825377.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478–486.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Köberl, M. (2020). The plant microbiome explored: Implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1732–1745.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- Boss, B. L., Wanees, A. E., Zaslow, S. J., Normile, T. G., & Izquierdo, J. A. (2022). Comparative genomics of the plant-growth promoting bacterium *Sphingobium* sp. strain AEW4 isolated from the rhizosphere of the beachgrass *Ammophila breviligulata*. *BMC genomics*, 23(1), 508.
- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., & Sakanari, J. A. (Eds.). (2016). *Bacilos grampositivos formadores de esporas: Bacillus y Clostridium*. En *Microbiología médica* (27^a ed.). McGraw-Hill Education.
- <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837§ionid=128956862>

Charles Darwin Foundation. (2025). *Galapagos Species Database: Solanum cheesmaniae*.

<https://datazone.darwinfoundation.org/en/checklist/?species=1116>

Corrales, C., & Astrin, J. J. (2023). Biodiversity Biobanking—a Handbook on Protocols and Practices. *Advanced Books, 1*, e101876.

Duan, M., Wang, L., Song, X., Zhang, X., Wang, Z., Lei, J., & Yan, M. (2023). Assessment of the rhizosphere fungi and bacteria recruited by sugarcane during smut invasion. *Brazilian Journal of Microbiology, 54*(1), 385-395.

EOSEcuador. (s.f.). *Geography and climate of the Galapagos*.

<https://www.eosecuador.travel/about/about-galapagos/geography-and-climate-of-the-galapagos.html>

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology, 15*(10), 579–590. P

Flores, S. 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.

Fundación Charles Darwin. (s.f.). *Base de datos de climatología de Galápagos*. DataZone.

<https://datazone.darwinfoundation.org/en/climate/>

Galapagos Science Center. (2022). *El biobanco del GSC conformará uno de los 7 biocentros que custodiarán los recursos genéticos de la megabiodiversidad existente en el Ecuador*. <https://www.galapagoscience.org/the-gsc-biobank-will-form-one-of-seven-bio-centers-that-will-guard-the-genetic-resources-of-the-existing-biodiversity-in-ecuador/>

Garcia, J., Gannett, M., Wei, L., Cheng, L., Hu, S., Sparks, J., ... & Kao-Kniffin, J. (2022). Selection pressure on the rhizosphere microbiome can alter nitrogen use efficiency and seed yield in *Brassica rapa*. *Communications Biology, 5*(1), 959.

- Gibson, M. J., Torres, M. D. L., Brandvain, Y., & Moyle, L. C. (2021). Introgression shapes fruit color convergence in invasive Galapagos tomato. *Elife*, 10, e64165.
- Hadland, N., Hamilton, C. W., & Duhamel, S. (2024). Young volcanic terrains are windows into early microbial colonization. *Communications Earth & Environment*, 5(1), 114.
- Hartman, K., Schmid, M. W., Bodenhausen, N., Bender, S. F., Valzano-Held, A. Y., Schlaeppi, K., & van der Heijden, M. G. (2023). A symbiotic footprint in the plant root microbiome. *Environmental microbiome*, 18(1), 65.
- Hickman, C. P. (2009). Evolutionary responses of marine invertebrates to insular isolation in Galapagos. *Galapagos Res*, 66, 32-42.
- Holmes, A. J., Bowyer, J., Holley, M. P., O'Donoghue, M., Montgomery, M., & Gillings, M. R. (2000). Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(2), 111-120.
- https://epiquest.s3.amazonaws.com/epiquest_in1000/GHBRUNXUJ5MK5XNQ4RKJQ6JYRBE7Z8YX/report/in1000.200719.report.zip
- Hu, D., Li, S., Li, Y., Peng, J., Wei, X., Ma, J., ... & Wang, Z. (2020). Streptomyces sp. strain TOR3209: a rhizosphere bacterium promoting growth of tomato by affecting the rhizosphere microbial community. *Scientific reports*, 10(1), 20132.
- Jiang, Z. M., Mou, T., Sun, Y., Su, J., Yu, L. Y., & Zhang, Y. Q. (2023). Environmental distribution and genomic characteristics of Solirubrobacter, with proposal of two novel species. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1267771.
- Jones, F. P., Clark, I. M., King, R., Shaw, L. J., Woodward, M. J., & Hirsch, P. R. (2016). Novel European free-living, non-diazotrophic *Bradyrhizobium* isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes—a genome comparison. *Scientific reports*, 6(1), 25858.

- Kapinusova, G., Lopez Marin, M. A., & Uhlik, O. (2023). Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1089630.gov/articles/PMC10027941/
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F.P., Salzberg, S.L. (2016) Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res* 12:1721-1729.
- Liu, S., Moon, C. D., Zheng, N., Huws, S., Zhao, S., & Wang, J. (2022). Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation. *Microbiome*, 10(1), 76.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- Maiti, P. K., & Mandal, S. (2022). Comprehensive genome analysis of Lentzea reveals repertoire of polymer-degrading enzymes and bioactive compounds with clinical relevance. *Scientific Reports*, 12(1), 8409.
- Pailles, Y., Awlia, M., Julkowska, M., Passone, L., Zemmouri, K., Negrão, S., ... & Tester, M. (2020). Diverse traits contribute to salinity tolerance of wild tomato seedlings from the Galapagos Islands. *Plant physiology*, 182(1), 534-546.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Raaijmakers, J. M., & Kiers, E. T. (2022). Rewilding plant microbiomes. *Science*, 378(6620), 599-600.

- Ramírez, G., Peralta, I. E., Rodríguez-Guzmán, E., Chávez-Servia, J. L., Sahagún-Castellanos, J., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2021). Climatic diversity and ecological descriptors of wild tomato species (*Solanum* sect. *Lycopersicon*) and close related species (*Solanum* sect. *Juglandifolia* y sect. *Lycopersicoides*) in Latin America. *Plants*, *10*(5), 855.
- Salinas de León, P. (2020). *Galapagos: A natural laboratory to understand and co-evolve with climate change*. Charles Darwin Foundation.
<https://www.darwinfoundation.org/en/news/all-news-stories/galapagos-a-natural-laboratory-to-understand-and-co-evolve-with-climate-change/>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press.
- Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, *11*(3), 296-310.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). *Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(3), 495–548.
- Wust PK, Foesel BU, Geppert A, Huber KJ, Luckner M, Wanner G, Overmann J. *Brevitalea aridisoli*, *B. deliciosa* and *Arenimicrobium luteum*, three novel species of *Acidobacteria* subdivision 4 (class *Blastocatellia*) isolated from savanna soil and description of the novel family *Pyrinomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; **66**:3355-3366.
- Zymo Research Corp. (s.f.). *ZymoBIOMICS® Service Report: Shotgun Metagenomic Sequencing* (Versión 8.0).

ANEXOS

ANEXO 1: POBLACIONES DE MUESTREO EN LAS ISLAS GALÁPAGOS

