

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento

Cambios en comunidades microbianas de la rizósfera de *Solanum betaceum* frente
enriquecimiento de la microbiota edáfica nativa con consorcios microbianos

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de
Magíster en Biociencias
Aplicadas con mención en
Biodescubrimiento.

Autor:

Calle Gill Diana Carolina

CI: 1207715283

Correo electrónico: dianacallegill@gmail.com

Director:

Eduardo José Chica Rodríguez, PhD

CI: 0912795101

Cuenca, Ecuador

23-noviembre-2022

Resumen

El uso de microorganismos nativos o introducidos representan una de las alternativas ante el uso de productos químicos sintéticos en la agricultura, ya que pueden ser aplicados como inoculantes biológicos (bioinoculantes), proporcionando el enriquecimiento de las comunidades microbianas edáficas; no obstante, a pesar de que éstos son utilizados para mejorar la productividad de los cultivos, aún es escasa la información acerca de sus efectos en las comunidades microbianas en la rizósfera de los cultivos y no reportan su seguimiento durante su establecimiento y/o desarrollo pos-inoculación. Por lo tanto, mediante metagenómica se determinó si la inoculación con microorganismos benéficos induce cambios en la diversidad de las comunidades microbianas residentes en la rizósfera de *S. betaceum.*, además de la estimación de la persistencia de *Trichoderma spp.*, con el uso de un protocolo específico de PCR.

Como resultado, no se reportaron cambios significativos en la estructura de la comunidad microbiana como consecuencia de la bioinoculación, a pesar de evidenciarse una ligera diferencia entre las muestras controles y tratamiento, ésta no puede ser atribuida directamente a la aplicación del bioinoculante. Al evaluar la persistencia de *Trichoderma spp.*, no se evidenció su establecimiento en la rizósfera del cultivo luego de 120 días posteriores a la inoculación. Sin embargo, el presente estudio, brinda una información preliminar y hasta ahora pionera acerca de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de *S. betaceum*, analizando su diversidad, monitoreo posterior inoculación. Unos de los resultados más significativos fue la estimación los filos y géneros de mayor abundancia y posiblemente endófitos, los cuales son esenciales para ser usados como un método para incrementar la resistencia de las plantas hospedantes a las enfermedades y mejorar la salud del suelo; por lo que en conjunto con futuras investigaciones que incluyan la influencia de otros factores, permitiendo avances biotecnológicos junto con la comprensión integral de la diversidad genética, dinámica de las comunidades microbianas y un mayor conocimiento de los perfiles microbianos de la rizosfera de este fruto caracterizado por poseer un importante valor nutritivo y en los últimos años ser considerado como una alternativa en la producción, diversificación y mercadeo de productos no tradicionales de la región andina del Ecuador.

Palabras clave: Consorcios microbianos. Bioinoculación. *S. betaceum.* *Trichoderma spp.*

Abstract

The use of native or introduced microorganisms represents one of the alternatives to the use of synthetic chemical products in agriculture since they can be applied as biological inoculants (bioinoculants), providing the enrichment of soil microbial communities. However, despite the fact that they are used to improve crop productivity, there is still little information about their effects on microbial communities in the rhizosphere of crops and their monitoring during their establishment and/or post-inoculation is not reported. Therefore, by means of metagenomics, it was determined whether the inoculation with beneficial microorganisms induces changes in the diversity of the microbial communities residing in the rhizosphere of *S. betaceum*., in addition to the estimation of the persistence of *Trichoderma spp.*, with the use of a specific PCR protocol.

As a result, no significant changes were reported in the structure of the microbial community as a consequence of bioinoculation, despite the evidence of a slight difference between the control and treatment samples, which cannot be directly attributed to the application of the bioinoculant. When evaluating the persistence of *Trichoderma spp.*, its establishment in the rhizosphere of the crop was not evidenced after 120 days after inoculation. However, the present study provides preliminary and, until now, pioneering information about the microbial communities present in the rhizosphere of *S. betaceum*, analyzing their diversity and monitoring after inoculation. As a result, biotechnological advances can be made in conjunction with a comprehensive understanding of genetic diversity, dynamics of microbial communities, and a greater understanding of the microbial profiles of the rhizosphere of this fruit, which is characterized by having an important nutritional value and, in recent years, being considered as an alternative in the production, diversification, and exploitation.

Keywords: Microbial consortia. Bioinoculation. *S. betaceum*. *Trichoderma spp.*

Índice del Trabajo

1. Introducción.....	8
2. Materiales y métodos	10
2.1 Descripción del sitio de estudio.....	10
2.2 Preparación del inóculo.....	10
2.3 Diseño experimental y recolección de muestras de suelo.....	10
2.4 Secuenciación y análisis metagenómico.....	11
2.5 Persistencia de los microorganismos introducidos (<i>Trichoderma spp.</i>) en la rizósfera de <i>S. betaceum</i>	12
3. Resultados y Discusión	13
3.1 Análisis metagenómico y estimación de la diversidad microbiana de la rizosfera de <i>S. betaceum</i>	13
3.2 Persistencia del microorganismo introducido a nivel de campo en cultivo de <i>S. betaceum</i>	18
4. Conclusiones.....	22
Agradecimientos	24
Referencias	24
Anexos	29

Índice de figuras

- Figura 1.** Diagrama de Venn. Muestra superposiciones de taxones entre grupos de control y tratamiento en diferentes rangos taxonómicos. Los valores son el número de taxones. A, nivel de filo; B, nivel de género. C: control, CT: control del tratamiento, T: tratamiento; terminación -D1: día 1 (primer muestreo preinoculación), -D120: día 120 posterior a la primera inoculación con el consorcio microbiano..... 14
- Figura 2.** Composición de la comunidad microbiana de la rizosfera de *S. betaceum*. El diagrama de barras muestra el top 15 de los géneros de mayor abundancia de las 4 muestras promediadas. Los taxones se organizaron de tal manera que el orden de las familias en A corresponde a los de sus géneros microbianos constituyentes en B. 15

Figura 3. Gráficos de diversidad alfa de la comunidad microbiana de la rizósfera de *S. betaceum*. Índice Chao1 utilizado para estimar el número de taxones diferentes, índice de diversidad de Shannon y Simpson utilizados para evaluar la riqueza de taxones y lecturas, Índice de Inverso de Simpson, utilizó para estimar la diversidad en lugar de dominancia..... 17

Figura 4. Crecimiento de tres aislados de *Trichoderma* spp. en medio PDA 5 días después de inoculación, muestra de frente (f) y reverso (r) de los aislados. .. 19

Figura 5. Representación de las características morfológicas microscópicas de *Trichoderma*: teñidas con azul de lactofenol (a-c) filiales y conidios. (d) conidióforos, (e) conidios, (f) Conidios e hifas. Observación realizada con objetivo 100X. 20

Figura 6. Análisis de electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR derivados de la amplificación de la región ITS1 e ITS2 de *Trichoderma* spp. Los geles muestran el marcador/escalera (E), control negativo (C-), control positivo (C+), muestra de la rizósfera previa inoculación (-1), muestra de la rizósfera 90 y 120 días posteriores a la inoculación (+90, +120). 21

Índice de tablas

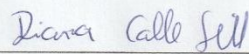
Tabla 1. Descripción morfológica de los aislados..... 19

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Diana Carolina Calle Gill, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Cambios en comunidades microbianas de la rizósfera de *Solanum betaceum* frente enriquecimiento de la microbiota edáfica nativa con consorcios microbianos”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 23 de noviembre de 2022



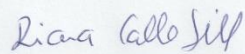
Diana Carolina Calle Gill

C.I: 1207715283

Cláusula de Propiedad Intelectual

Diana Carolina Calle Gill, autora del trabajo de titulación “Cambios en comunidades microbianas de la rizósfera de *Solanum betaceum* frente enriquecimiento de la microbiota edáfica nativa con consorcios microbianos”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 23 de noviembre de 2022



Diana Carolina Calle Gill

C.I: 1207715283

Cambios en comunidades microbianas de la rizósfera de *Solanum betaceum* frente enriquecimiento de la microbiota edáfica nativa con consorcios microbianos

Diana Calle¹, Eduardo Chica², Julio Bonilla²

^{1,2} Universidad de Cuenca

Universidad de Cuenca, eduardo.chica@ucuenca.edu.ec

² Escuela Politécnica del Litoral

Escuela Politécnica del Litoral, jbonill@espol.edu.ec

1. Introducción

En la rizósfera, la zona en estrecha relación e influenciada por las raíces de las plantas, residen un gran número de microbios e invertebrados donde las interacciones entre plantas y microorganismos son más intensas y variadas llegando a ser considerada como una de las interfaces más dinámicas del planeta. Estas interacciones son de importancia económica siendo fundamentales para las estrategias de manejo de control de nutrientes y plagas en la agricultura; también son esenciales para la función y el mantenimiento de muchos ecosistemas naturales, dado a que los organismos presentes en la microbiota de la rizosfera pueden tener efectos significativos tanto en el crecimiento, nutrición y en la salud de las plantas en los ecosistemas agrícola (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012; Abbott & Murphy. 2004; Bonfante & Anca. 2009).

Actualmente, el modelo convencional de la intensificación agrícola, ha afectado gravemente al ambiente y la biodiversidad, especialmente con los crecientes problemas asociados con el uso de productos químicos sintéticos, los cuales afectan a las comunidades microbianas del suelo perjudicando sus hábitats, influyendo en sus funciones, alterando sus poblaciones, su estructura y diversidad (Tiftonell. 2014; Kibblewhite et al. 2008; Geiseller & Scow 2014); por lo que surge el promover una agricultura sostenible que implique consigo una disminución gradual del uso de agroquímicos sintéticos junto con la integración de enfoques ecológicos y moleculares que además de permitir una mejor comprensión de los componentes y los procesos que operan en el ecosistema del suelo y analizar la diversidad de las comunidades micobianas y como los microorganismos interactúan con el medio (Schoonhoven, et al. 2005; Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012; Mendes et al., 2011; Prosser et al., 2006).

En este contexto, el uso de microorganismos nativos o introducidos representan una de las alternativas ante estos desafíos, ya que pueden ser aplicados como inoculantes biológicos (bioinoculantes), que proporcionan el enriquecimiento de las comunidades microbianas edáficas constituyendo una estrategia que permite el aprovechamiento de los efectos beneficiosos de ciertos grupos de microorganismos sobre los cultivos; sin embargo, a menudo resulta complejo su replicabilidad de manera consistente ya que su efectividad está vinculada a las condiciones edafoclimáticas de la zona (Singh et al., 2011)

No obstante, a pesar de que los bioinoculantes son utilizados para mejorar la productividad de los cultivos, aún es escasa la información acerca de sus efectos en las comunidades microbianas en la rizosfera de los cultivos y no reportan el seguimiento de los microorganismos inoculados durante su establecimiento y/o desarrollo pos-inoculación. Es por ello que se justifica la necesidad de desarrollar estudios de caracterización de bioinoculantes complejos bajo condiciones de campo locales en sistemas de cultivo específicos a fin de iniciar el desarrollo de procesos que permitan optimizar el potencial biológico de los suelos agrícolas para la intensificación sostenible de la agricultura en el Ecuador.

Respecto a cultivos en Ecuador, la región andina es el hogar nativo de muchas frutas poco estudiadas con un alto potencial para su desarrollo comercial, uno de estos cultivos es que ha atraído un interés creciente en los últimos años es el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) conocido internacionalmente como tamarillo, que además de poseer un importante valor nutritivo (Prohens & Nuez, 2001), es considerado como una alternativa en la producción, diversificación y mercadeo de productos no tradicionales (Acosta-Quezada et al., 2015; Hallam., 2004). Se han llevado a cabo algunas investigaciones acerca de esta planta y su cultivo (Acosta-Quezada et al., 2012; Bohs, 1989, 1995, 2001, 2007; Mertz et al., 2009; Orrinco et al., 2013; Vasco et al., 2009); sin embargo, información acerca de la dinámica y caracterización de las comunidades microbianas edáficas es escasa, lo que omitiendo la utilidad en términos agronómicos como es la elaboración de bioinoculantes específicos para *S. betaceum*, lo que se considera de gran interés para la producción y comercialización al mercado nacional e internacional.

Con base en estos antecedentes, en la presente investigación se propuso la caracterización de los cambios producidos en las comunidades microbianas de la rizósfera de plantas de *S. betaceum* frente al enriquecimiento de la microbiota edáfica nativa con consorcios microbianos bajo condiciones de campo utilizando técnicas moleculares, por lo que se determinó mediante metagenómica si la inoculación con microorganismos benéficos induce cambios en la diversidad de las comunidades de microorganismos residentes en la rizósfera de *S. betaceum*, además de la estimación de la persistencia de *Trichoderma spp.* introducido en la rizósfera del cultivo bajo condiciones de campo con el uso de un protocolo específico de PCR. Los resultados del proyecto pretenden ser un aporte básico para el diseño de suelos funcionales más complejos que aprovechen las funciones

ecológicas de la comunidad microbiana, diseñar y promover estrategias sostenibles en sistemas de producción agrícola e incrementar la productividad de los cultivos, minimizando la dependencia de insumos externos.

2. Materiales y métodos

2.1 Descripción del sitio de estudio

El cultivo de *S. betaceum* en el que se desarrolló el experimento estuvo ubicado en la Granja “El Romeral” de la Universidad de Cuenca, localizada en el km 10 de la vía Paute – Guachapala, provincia del Azuay (2° 45' 50" N, 78° 42' 51" E). La granja está ubicada dentro de la subcuenca del Río Paute, posee un clima subtropical y una formación ecológica de bosque seco – Montano Bajo (bs. MB), está situada a 2200 msnm, cuenta con una precipitación anual que varía entre 500 a 1000 mm y su temperatura media anual oscila entre 15°C a 18°C. El suelo tiene una textura franco arenosa, pH 6.3, y el cultivo recibió una fertilización orgánica y química durante su desarrollo y fue irrigado con un sistema por goteo automatizado.

2.2 Preparación del inóculo

La selección de microorganismos se efectuó en base a estudios previos de proyectos de investigación realizados por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cuenca, los cuales incluyeron cepas disponibles comercialmente con comprobados efectos fitoestimulantes y fitoprotectores con sus respectivos reportes en la literatura científica. Se seleccionaron los hongos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces spp.* y *Trichoderma spp.*, con los cuales se prepararon mezclas en suspensión (consorcios microbianos).

2.3 Diseño experimental y recolección de muestras de suelo

La recolección de muestras se empezó en octubre del 2019, cuando el cultivo correspondía a una plantación homogénea en fase productiva. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado en el cual se seleccionaron unidades experimentales compuestas por tres plantas consecutivas de características similares dentro de una misma fila de cultivo. Se evaluó un solo tratamiento que consistió en la aplicación mensual de un consorcio de microorganismos benéficos. Como control se utilizaron plantas que no recibieron la aplicación del consorcio. Ambos grupos recibieron el mismo tratamiento agronómico en lo que respecta a riego, fertilización y control de problemas sanitarios foliares.

Para el estudio metagenómico se recolectaron muestras al inicio del experimento previo a la primera inoculación (D1) y a los 120 días posteriores a ésta (D120). Por otra parte, para evaluar la persistencia de los microorganismos introducidos (*Trichoderma spp.*) se recolectaron muestras previo a la primera

inoculación y a los 90 y 210 días posteriores a ésta. En cada muestreo se recolectó una cantidad aproximada de 10 g de suelo rizosférico por cada una de las plantas experimentales, éstas fueron colocadas en tubos de polipropileno y trasladadas en una hielera al laboratorio y donde fueron almacenadas a -20°C hasta realizar las extracciones de ADN.

2.4 Secuenciación y análisis metagenómico

Extracción de ADN genómico. Para caracterizar e identificar la comunidad microbiana asociada con la rizosfera del *S. betaceum*, el flujo de trabajo inició con la extracción del ADN genómico utilizando el kit PowerSoil (QIAGEN) según las indicaciones del fabricante. La calidad y concentración fueron cuantificadas mediante fluorometría con el kit de Qubit™ dsDNA HS and BR Assay (ThermoFisher) y por espectrofotometría (Anexo 1.)

Preparación de librerías y secuenciación metagenómica mediante Nanopore. Para la preparación de la biblioteca se aplicó el protocolo de Nanopore Native barcoding genomic DNA (versión: NBE_9065_v109_revJ_23May 2018) con los kits Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104, éste fue sustituido por EXP-NBD103) y 13-24 (EXP-NBD114), proporcionado por Oxford Nanopore Technologies (ONT) con el kit Ligation Sequencing (SQK-LSK109) al ADN extraído, incluida la reparación de ADN, la preparación de extremos, la ligadura de adaptadores y la preparación de bibliotecas, siguiendo las instrucciones del fabricante. La librería resultante se secuenció con MinION Mk 1B usando una celda de flujo R9.4.1, FLO-MIN106, durante 87 horas. Una vez finalizada la secuenciación, los datos sin procesar en formato fast5 fueron utilizados para realizar el basecalling en tiempo real en el software MinKOW v 21.06.10. (Guppy v. 3.4.5 integrado) en modo de super alta precisión (minimum qscore=10). los datos resultantes de este último proceso fueron utilizados para la asignación taxonómica en la plataforma de análisis de datos en línea EPI2ME (WIMP v3.3.2) basada en la nube de Oxford Nanopore Technology (ONT) empleando la base de datos del NCBI.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se llevó a cabo en R v.4.1.0, mediante los paquetes Vegan 2.5–7 (Oksanen et al., 2020), Microbiome v1.16.0 (Lahti & Shetty, 2012) , Limma v 3.50.3 (Ritchie et al., 2015). Una vez obtenida la clasificación taxonómica, se procedió a realizar el análisis a nivel de género, donde el conteo de los individuos por repetición fue promediado para obtener un solo dato que represente a las condiciones establecidas (control y tratamiento). Para evaluar y comparar la diversidad estructural de la comunidad microbiana de la rizósfera de *S. betaceum*, se calcularon los índices de Shannon-Weiner y Simpson, la riqueza se estimó con Chao1 y la dominancia con el índice del inverso de Simpson (Chao, 1984; Gini, 1912; Shannon & Weaver, 1949; Simpson, 1949). Para la comparación de la diversidad de la comunidad microbiana entre muestras y tratamiento, se aplicó el análisis PERMANOVA (PERmutational Multivariate ANalysis Of VAriance) (Anderson, 2017), permitiendo estimar el efecto e importancia de la diversidad beta.

2.5 Persistencia de los microorganismos introducidos (*Trichoderma spp.*) en la rizósfera de *S. betaceum*

Aislamiento y caracterización morfológica de cepas. Al proporcionar las condiciones adecuadas, las esporas o el micelio viable de *Trichoderma spp.*, presente en formulaciones líquidas comerciales, germinaron y formaron colonias típicas. Estas fueron caracterizadas macroscópica y microscópicamente de la siguiente manera: Se extrajo 8 µL de la formulación líquida comercial y se inoculó en cajas petri con FMI y fueron almacenadas a 23 °C ± 2, monitoreando el crecimiento cada 24 horas hasta la aparición de colonias para luego ser extraídas y sembradas en cajas petri con medio de agar de dextrosa y papa (PDA). La identificación morfológica se realizó mediante el reconocimiento de su estructura macroscópica considerando aspectos tales como el color, forma y textura de la colonia tanto en el reverso como anverso de la caja. Mientras que el análisis microscópico micelio activo y esporas del aislado y se colocó sobre un portaobjetos, se tiñó con una gota de azul de lactofenol para luego realizar la respectiva observación e identificación en un microscopio óptico acoplado a una cámara digital, las imágenes se capturaron bajo el objetivo de 100X usando aceite de inmersión; tanto para la identificación macroscópica y microscópica se utilizó una serie de claves taxonómicas (Barnett & Hunter, 1998; Gams & Bissett, 1998; Harman & Kubicek, 2002).

Extracción de ADN de los aislados. Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de (Mořková & Vytřasová, 2012) con modificaciones. En un tubo eppendorf de 2 mL se agregó ~ 100 mg de micelio fresco junto con 500 µL de buffer TE (homogeneizado con vortex por 10 segundos) y luego centrifugado a 16000 RCF durante 5 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, se agregó 300 µL de buffer de lisis (1% SDS, 0.5% Tween 20, 10 mM Tris-Hcl pH 8 y 1 mM EDTA) y 4 perlas de metal, se homogeneizó la solución durante 3 minutos (dos veces) mediante un TissueLyser LT (QIAGEN). Después de un baño maría (65°C por 15 minutos), se adicionó 150 µL de acetato de sodio (5M) y se almacenó a -80°C por 10 minutos, las muestras fueron descongeladas manualmente y centrifugadas, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se adicionó isopropanol (1:1) incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, luego el ADN precipitado se sedimentó por centrifugación y se descartó el sobrenadante, se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se procedió a realizar una última centrifugación para luego remover totalmente etanol (secado a 65°C). Finalmente, el pellet se disolvió en 100 µL de buffer TE y posteriormente se determinó la calidad y concentración. Respecto al ADN de las muestras de la rizosfera, fue extraído como se describió previamente en el punto 2.4.

Condiciones de PCR. *Trichoderma spp* fue monitoreada en diferentes momentos durante el desarrollo del proyecto, para lo cual se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se realizaron ensayos para validar las condiciones y primers. Se amplificó la región ITS1-ITS2 utilizando los primers específicos para *Trichoderma spp.* uTf (5'- AACGTTACCAAACACTGTTG-3') y uTr (5'- AAGTTCAGCGGGTATTCCT-3') diseñados y comprobados por (Hagn et al., 2007)

, esperando un fragmento de 540 pb. Se preparó cada reacción con un volumen final de 10 µL que contenía 5 µL de Platinum High Fidelity Master Mix (Invitrogen), 1 µL de cada primer (10 mM), 1 µL de ADN genómico (≥100ng) y 2 µL de agua miliQ. La reacción se corrió en un termociclador bajo el siguiente programa: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, una extensión final a 72 °C por 10 minutos y un enfriamiento final a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1 %), se mezclaron los fragmentos de ADN productos de la amplificación (7 µL) con 2 µL de buffer de carga y 0.5 µL de bromuro de etidio, se utilizaron 3 µL de marcador de peso molecular de 1Kb (Plus DNA ladder, Invitrogen); las condiciones de corrida de la cámara de electroforesis fueron 100 voltios por 30 min, los fragmentos de ADN fueron visualizados con un foto-documentador con luz ultravioleta.

3. Resultados y Discusión

3.1 Análisis metagenómico y estimación de la diversidad microbiana de la rizosfera de *S. betaceum*

Flujo de trabajo de secuenciación metagenómica para la caracterización de comunidades microbianas en *S. betaceum*. La composición de la comunidad microbiana de la rizosfera de *S. betaceum* se determinó mediante un análisis metagenómico del ADN aislado del set de muestras mediante la secuenciación ONT, el output de nanoporos dio como resultado 412.755 lecturas con un rendimiento de 608.1 Mb, 167.003 lecturas fueron clasificadas taxonómicamente de acuerdo a la base de datos del NCBI. El set de datos fue analizado a nivel de género, sin embargo, los taxones correspondientes a *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Homo sapiens*, presentes en una sola muestra, fueron excluidos del análisis por tratarse de contaminación o algún artefacto en el experimento. De las lecturas restantes se promedió el número de taxones (repeticiones) para cada muestra.

Composición de la comunidad microbiana de la rizosfera de *S. betaceum*. Se realizó un análisis preliminar de la composición taxonómica de las cuatro muestras de la rizosfera de *S. betaceum* para comprender la diversidad microbiana. El análisis metagenómico indicó un total de 4 reinos únicos, 27 filos, 61 clases, 134 órdenes, 261 familias y 724 géneros en las 4 muestras (C-D1, C-D120, CT-D1 y T-D120). Los datos revelaron que del total de lecturas, el 95% corresponden a Bacteria siendo *Proteobacterias* y *Actinobacterias* los filos dominantes con un 50 % y 22% de presencia, respectivamente. El análisis de Venn (Figura 1) muestra que todos los grupos compartían 18 filos centrales y 433 géneros.

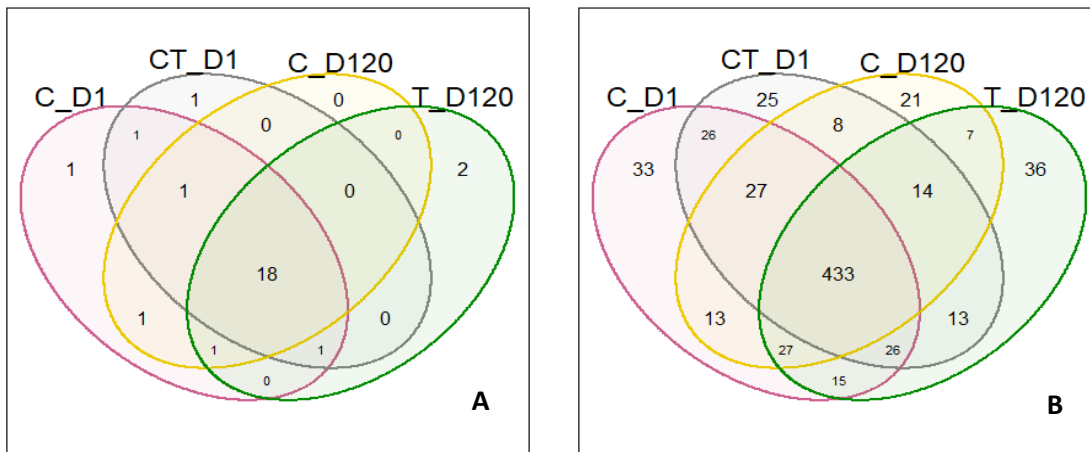


Figura 1. Diagrama de Venn. Muestra superposiciones de taxones entre grupos de control y tratamiento en diferentes rangos taxonómicos. Los valores son el número de taxones. A, nivel de filo; B, nivel de género. C: control, CT: control del tratamiento, T: tratamiento; terminación -D1: día 1 (primer muestreo preinoculación), -D120: día 120 posterior a la primera inoculación con el consorcio microbiano

Acerca de la clasificación a nivel de género, se determinó que 15 fueron los de mayor abundancia (Figura 2), destacando los géneros *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Bradyrhizobium* y *Sphingomonas*, los cuales aparecieron en diferentes porcentajes en cada una de las muestras: Para C-D120 el dominante fue *Mycobacterium* (16%), seguido de *Streptomyces* (~5%); en C-D1 fueron *Streptomyces* (~7%) y *Nocardioides* (~5%), para CT-D120 en mayor abundancia se presentaron *Streptomyces* y *Sphingomonas*, mientras que para T-D120 fueron *Streptomyces* (~7%) y *Bradyrhizobium* muy seguido de *Sphingomonas* (~5% c/u). Además, se logra evidenciar que las muestras de C-D1, CT-D120 y T-D120 mantienen un patrón similar respecto a su abundancia taxonómica nivel de género, siendo C-D120 el que presentó una tendencia diferente al mantener un taxon superior a los demás, evidenciando su abundancia en el set de datos.

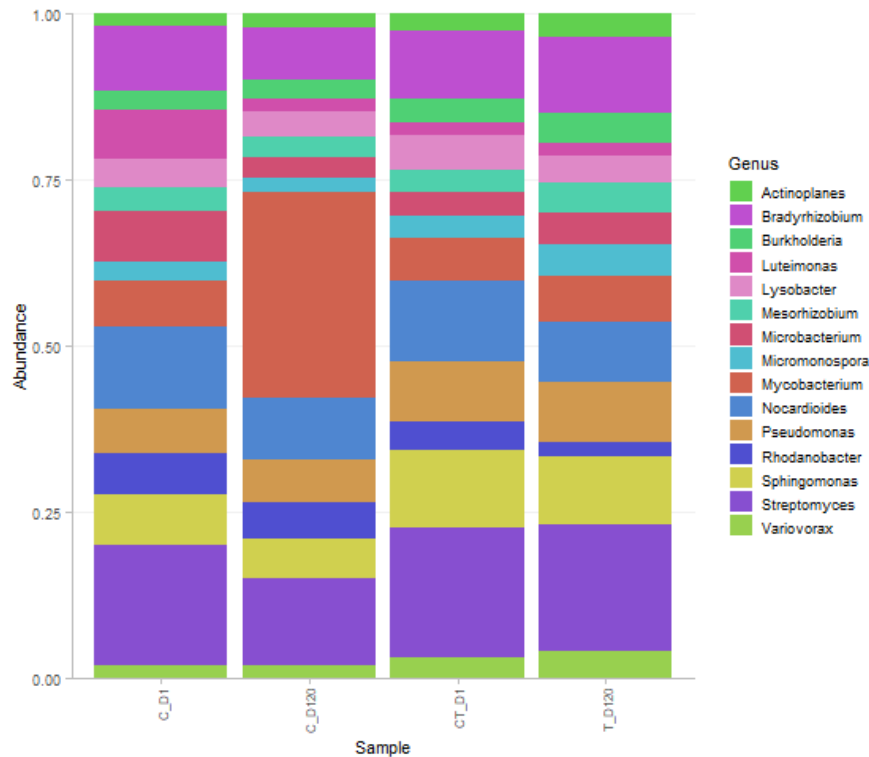


Figura 2. Composición de la comunidad microbiana de la rizosfera de *S. betaceum*. El diagrama de barras muestra el top 15 de los géneros de mayor abundancia de las 4 muestras promediadas. Los taxones se organizaron de tal manera que el orden de las familias en A corresponde a los de sus géneros microbianos constituyentes en B.

La diversidad y dominancia de los filos *Proteobacterias* y *Acidobacterias* es bastante pronunciada junto con una alta diversidad ecológica en comparación con los demás filos existentes en las muestras extraídas de la rizósfera de *S. betaceum*. Estos dos filos dominantes son los que generalmente se encuentran en la rizosfera de los cultivos, pero la abundancia de estos varía dependiendo las condiciones de la zona y del propio cultivo (Oyuela Aguilar et al., 2020; Qiao et al., 2017) ; ambos filos suelen ser considerados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal y participan en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre del suelo de la rizosfera (Kalam et al., 2020; Kersters et al., 2006), estudios de estos constituyentes hasta ahora no cultivables de la población microbiana del suelo a través de enfoques dependientes e independientes del cultivo han revelado la esencia de su bioactividad y sus funciones ecológicas en los ecosistemas planta-suelo (Huber et al., 2016; Lladó et al., 2018). Sin embargo, el filo es una clasificación amplia para describir la función potencial del microbioma y el papel ecológico que desempeñan otros filos sigue siendo poco conocido debido a que muchas especies que pertenecen a estos filos siguen siendo difíciles de cultivar.

Respecto a los 5 géneros más representativos de las comunidades microbianas de la rizosfera de *S. betaceum*, tres pertenecen al filo de *Actinobacterias* (*Streptomyces*, Nocardioideas, *Mycobacterium*) y dos a *Proteobacterias* (*Bradyrhizobium* y *Sphingomonas*). Siendo dos de ellas las de mayor abundancia en todas las muestras: *Streptomyces* es el género más común y conocido de *Actinobacterias*, de acuerdo a la literatura, éstas inducen respuestas de defensa en cultivos económicamente importantes; en los sistemas agrícolas se ha demostrado que suprimen diversos patógenos de plantas, incluidos hongos, bacterias y nematodos mediante la secreción de metabolitos secundarios bioactivos y la inducción de resistencia del huésped (Kurth et al., 2014; Samac & Kinkel, 2001; Xiao et al., 2002), las cuales probablemente estén influenciados en parte por la disponibilidad de recursos en el suelo (Blanco et al., 2007; Fravel, 1988; Hoitink & Boehm, 1999).

Además, se ha demostrado que el aumento de nutrientes de las comunidades microbianas del suelo a través de técnicas ecológicas tales como abonos verdes, mejoran la densidad y las actividades inhibitorias de *Streptomyces* (Wiggins & Kinkel, 2005b, 2005a), lo cual indica que tanto la calidad como la cantidad de los recursos disponibles son importantes para influir en la cantidad y la composición fenotípica de las comunidades microbianas del suelo.

Por otro lado, se conoce que las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* se encuentran de forma natural en el ambiente, éstas suelen crecer lentamente en relación con otros microorganismos y su competencia es relativamente baja en comparación con otros géneros. Sin embargo, existen factores como la resistencia a los ácidos, la supervivencia anaeróbica y el metabolismo de los compuestos de carbono recalcitrantes que permiten la supervivencia y el crecimiento de estas bacterias en una amplia gama de hábitats naturales y creados por humanos. En el suelo, se encuentran grandes cantidades de micobacterias ambientales en zonas cercanas a bosques boreales ricos en turba. A su vez, la supervivencia y el crecimiento de protozoos y amebas permiten que las micobacterias ambientales persistan en hábitats sujetos a depredación, su estabilidad en el suelo durante doce meses o más es asociada además con la presencia de rumiantes (Falkinham III, 2009; White et al., 2010).

Por otro lado, poseen la capacidad para degradar y metabolizar una variedad de hidrocarburos complejos, incluidos los contaminantes, investigaciones han descubierto su presencia y diversidad especialmente en suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cheung & Kinkle, 2001; Miller et al., 2004). Bajo este antecedente, *Mycobacterium* estuvo presente en todas las 4 muestras; sin embargo, en C-D120 fue mayor (16%), por lo que se estima la posibilidad de que las plantas correspondientes a esas muestras pudieron haber sido afectada por algún tipo de contaminación externa proveniente de alguna sustancia hidrocarbúrica, aunque también se establece como posibilidad la presencia de animales que rondaban el cultivo de *S. betaceum*, al estar ubicado en una zona rural poco habitada cercana a una fuente de agua; ambas hipótesis se plantean como posibilidad de influir en su dinámica y modo de acción.

Diversidad y riqueza microbiana. Los recuentos microbianos a nivel de género se exploraron inicialmente para determinar si los datos generales mostraban una separación entre ellos y con el tratamiento (inoculado). Las métricas de diversidad alfa Chao1, Shannon, Simpson y el inverso de Simpson (Anexo 2) se utilizaron para evaluar la riqueza, diversidad y la uniformidad dentro y entre los grupos de las comunidades microbianas correspondientes a los controles (C), control del tratamiento (CT) y el tratamiento (T). En la figura 3, la gráfica correspondiente a Chao1 (riqueza), se observa que las muestras correspondientes a C-D1 y CT-D1, en términos de riqueza son ligeramente superiores a las muestras después de 120 días del ensayo. En Shannon, las 4 muestras presentan una alta diversidad microbiana con valores >4 , sin embargo, CT-D1 y T-D120 tuvieron una puntuación superior a 5 siendo un poco más dominante T-D120 con una puntuación de 5.14. La misma tendencia en el comportamiento de las muestras se presentó en el índice de Simpson, donde CT-D1 y T-D120 obtuvieron las puntuaciones más altas. Sin embargo, el inverso de Simpson logra determinar una diferencia en su dominancia a estructura de la comunidad bacteriana entre los grupos, siendo T-D120.

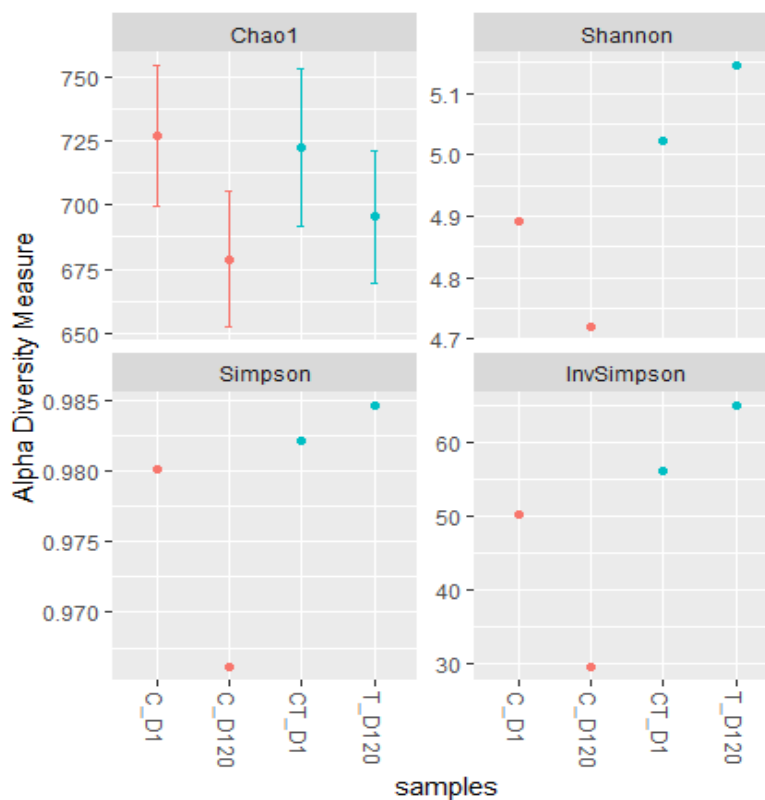


Figura 3. Gráficos de diversidad alfa de la comunidad microbiana de la rizósfera de *S. betaceum*. Índice Chao1 utilizado para estimar el número de taxones diferentes, índice de diversidad de Shannon y Simpson utilizados para evaluar la riqueza de taxones y lecturas, Índice de Inverso de Simpson, utilizó para estimar la diversidad en lugar de dominancia

Las diferencias entre los grupos de muestras para todas las métricas no fueron significativas, la prueba de Bray-Curtis (Anexo 3) indicó que ni para el tiempo de muestreo (día 1 y día 120, $p > 0.16$) ni las condiciones (controles vs tratamiento, $p > 0.5$). También se observó una situación similar para los datos de la diversidad beta estimados por un análisis PERMANOVA (Anexo 4) indicando que estadísticamente son similares entre el tiempo de muestreo ($p > 0.05$) así como entre las condiciones ($p > 0.166$). Estos resultados pueden interpretarse de manera que, aparentemente la inoculación con los consorcios microbianos no tuvo un efecto significativo respecto a modificar la microbiota de la rizósfera durante el periodo de inoculación ya que la comunidad microbiana se mantuvo estable, su abundancia y diversidad no tuvieron tampoco diferencias marcadas; sin embargo, T-120, a excepción de la riqueza, sus valores fueron ligeramente superiores a las demás muestras. No obstante, no se puede afirmar que sean estadísticamente diferentes. En este aspecto existen algunas hipótesis que radican en la intervención de mecanismos directos e indirectos los cuales pudieron influir en la incidencia de los microorganismos inoculados, tales como que su aplicación en los campos aún es poco explorada y muy generalizada considerando la diversidad de cultivos existentes, la región donde estos se producen y las condiciones edafoclimáticas, además del genotipo microbiano, la eficacia de aislamiento e inoculación que estos conllevan; por lo que las formulaciones comerciales basadas en estos microorganismos no siempre tienen la eficacia deseada (Bashan, 1998; Bashan et al., 2014; Dobbelaere et al., 2001)

3.2 Persistencia del microorganismo introducido a nivel de campo en cultivo de *S. betaceum*.

Caracterización morfológica macroscópica y microscópica. Las colonias de aislados de *Trichoderma* se cultivaron en medio PDA durante 10 días a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad. En términos generales, con base en la observación macroscópica en cajas Petri con medio PDA (Figura 4), los aislados presentaron una forma regular (se extendieron desde el centro hacia los extremos de la caja), el micelio se mantuvo en una elevación plana y pigmentación de blanca a verdosa, el color verdoso apareció al tercer o cuarto día después del crecimiento. La formación de las colonias fue rápida, tardando de cinco a siete días en colonizar completamente la caja, respecto al reverso, se revelaron aproximadamente al quinto día tonalidades blanquecinas, verde pálido y cremosas. Logrando obtener 3 aislados con características macroscópicas diferentes (tabla 1 y figura 4).

Tabla 1. Descripción morfológica de los aislados

N° Aislado	Características macroscópicas	
	Color de colonia	Forma y textura de colonia
T1	<i>Frente:</i> Blanco con centro verde y puntos amarillos. <i>Reverso:</i> cremoso	Micelio de consistencia esponjoso, crecimiento abundante en el centro
T2	<i>Frente:</i> Blanco con tonalidad verdosa hacia el fondo <i>Reverso:</i> Cremoso con tonalidad verde pálido hacia el centro	Colonia con crecimiento medio en el centro, presencia de uno o dos anillos concéntricos cerca de la zona del inóculo con una producción densa de micelio plano
T3	<i>Frente:</i> Blanco hacia el centro verdoso. <i>Reverso:</i> Cremoso extendido homogéneamente en toda la placa	Micelio abundante y esponjoso con crecimiento homogéneo

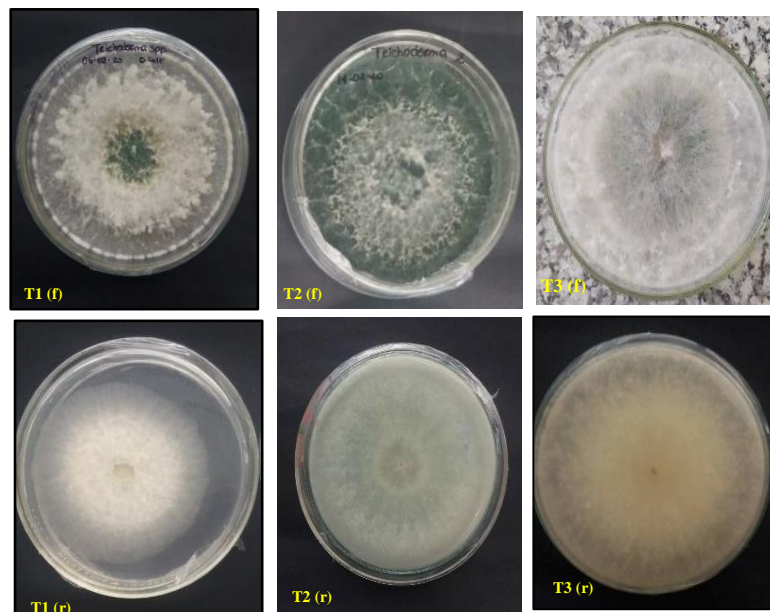


Figura 4. Crecimiento de tres aislados de *Trichoderma spp.* en medio PDA 5 días después de inoculación, muestra de frente (f) y reverso (r) de los aislados.

En cuanto a los resultados de las observaciones y caracterización microscópica (Figura 5), en términos generales los aislados presentaron hifas hialinas con conidios globosos y algunos ligeramente ovoides hialinos de pared lisa tanto individuales como en grupos, conidióforos largos, filiales anchos por el centro y alargadas en la base agrupadas como racimos.

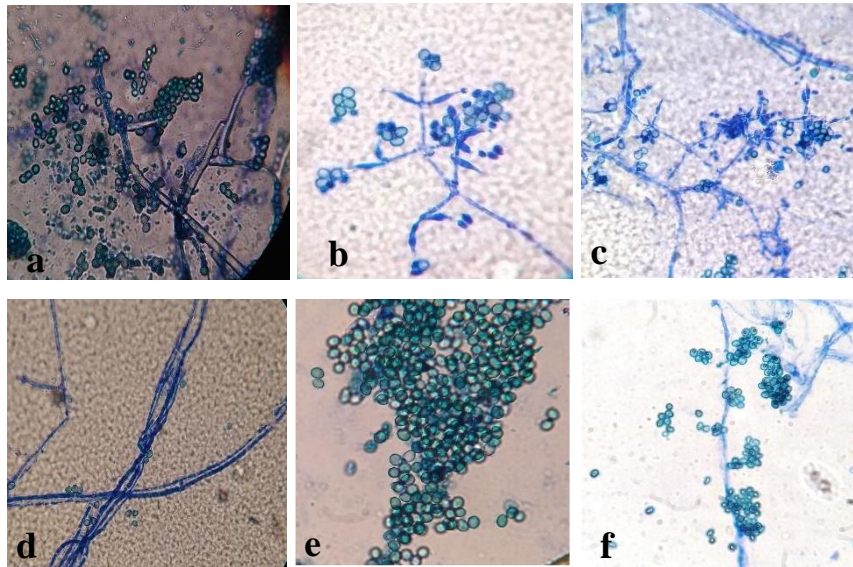


Figura 5. Representación de las características morfológicas microscópicas de *Trichoderma*: teñidas con azul de lactofenol (a-c) filiales y conidios. (d) conidióforos, (e) conidios, (f) Conidios e hifas. Observación realizada con objetivo 100X.

Caracterización molecular (prueba de PCR). En el presente estudio se evaluó un solo tratamiento, en el cual se realizó un monitoreo de *Trichoderma spp.* en la rizósfera de *S. betaceum* en tres tiempos: previa inoculación, 90 y 120 días posterior a ésta. Sin embargo, al observar los geles del análisis de PCR (Figura 6), no se detecta la presencia de *Trichoderma*, lo cual puede ser interpretado desde varios puntos de vista. Como se conoce, ciertas especies de este género son más susceptibles a determinados parámetros edafoclimáticos, tales como que se muestran ser más prósperas durante meses más frescos mientras que otras son más persistentes durante meses más cálidos, a su vez, puede crecer en los suelos con un pH entre 2.5 a 9.5, siendo aquellas especies que prefieren los suelos con mayor acidez tienden a presentar mayor tolerancia de crecimiento y son generalmente menos agresivas (Gams & Bissett, 2002; Howell, 2003)

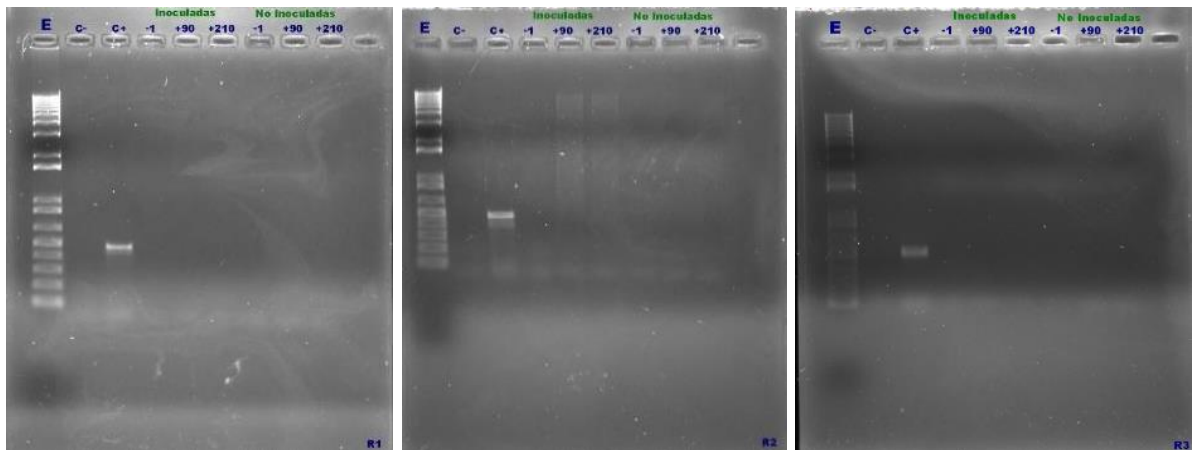


Figura 6. Análisis de electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR derivados de la amplificación de la región ITS1 e ITS2 de *Trichoderma* spp. Los geles muestran el marcador/escalera (E), control negativo (C-), control positivo (C+), muestra de la rizósfera previa inoculación (-1), muestra de la rizósfera 90 y 120 días posteriores a la inoculación (+90, +120).

Por otro lado, un factor primordial para lograr la proliferación a nivel radicular y posteriormente en su entorno, es superar la competencia impuesta por el hábitat autóctono de la rizósfera o sustrato (Chao et al., 1986). Teniendo como antecedentes el análisis metagenómico de las muestras recolectadas previa inoculación, *Trichoderma* desde un principio no constaba como microorganismo nativo de la rizósfera de *S. betaceum*, lo cual conduce a la posibilidad de ser la razón por el cual perdió su viabilidad rápidamente; es decir, que su introducción en el sistema edáfico haya resultado ser un breve reservorio para las esporas y luego ser desplazadas por sustancias inhibitoras que evitaron su posterior establecimiento.

Bajo esta temática y considerando a *Trichoderma* como un agente de biocontrol, varios estudios destacan que al utilizar cepas nativas aisladas de suelos y áreas circundantes de la planta experimental, se logra un mejor efecto debido a su pronta adaptación a las condiciones ambientales específicas, tales como la temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes, siendo una estrategia adecuada para superar las preocupaciones relacionados frente la introducción de microorganismos exógenos y mostrar un mejor desempeño antagonista (Anees et al., 2010; Ferreira & Musumeci, 2021; Howell, 2003). Ante una perspectiva similar y utilizando el término “competencia de la rizósfera” (Ahmad & Baker, 1987; Schmidt, 1979), que hace referencia a la habilidad de un microorganismo para crecer y actuar en una rizósfera desarrollada, (Ahmad & Baker, 1987; Sariah et al., 2005)

mencionan que existen diferencias notables al inocular un sustrato con cepas nativas e introducidas, cuyos resultados difieren respecto a su mejor adaptabilidad y persistencia; estas mejoras y rendimiento incrementan si se emplean dichas cepas en condiciones controladas, bajo la inoculación directa en un sustrato estéril, originando un ambiente más favorable para la proliferación de hongos, aumentando las densidades sustancialmente. Además, existe evidencia de que aparentemente este hongo no suele ser muy competitivo al ser inoculado en cultivos que han pasado su etapa de establecimiento (Ahmad & Baker, 1987; W. Chao et al., 1986; Papavizas, 1982)

Ante lo expuesto, se puede considerar que la compatibilidad entre el aislado fúngico, la variedad huésped (planta), el sustrato y la dosis aplicada pueden desempeñar un papel importante en la proliferación y persistencia de *Trichoderma spp.* en un medio edáfico. El desarrollo y aplicación de estrategias sostenibles con el ambiente, involucran el desafío de mantener poblaciones estables de agentes de control biológico sin provocar alteraciones negativas significativas en las comunidades presentes ya en el suelo, por lo cual se requiere de un conocimiento profundo de la ecología de los microorganismos a introducir. De modo que, como lo mencionan (Hagn et al., 2003; Setälä et al., 2005) se debe de considerar algunos parámetros tales como la calidad y características fisicoquímicas del suelo, el contenido de agua, el pH y, sobre todo, el historial del cultivo, la etapa de desarrollo de la planta, la colonización con patógenos y el estado fisiológico de la planta, el tratamiento con pesticidas o fertilizantes que mantiene el cultivo, la ubicación geográfica, el sistema de riego e inclusive la especie o genotipo de planta; en este aspecto, este último factor es relevante ya que se sabe relativamente poco acerca de cómo estos parámetros influyen en las comunidades de hongos en la rizósfera, especialmente en cultivos de *S. betaceum* de la región andina.

4. Conclusiones

Con base en el análisis estadístico y gráficos de diversidad, a pesar de evidenciarse una ligera diferencia entre las muestras controles y tratamiento, ésta no puede ser atribuida directamente a la aplicación del bioinoculante, dado a que C-D1 presentó mayor número de lecturas para el género *Mycobacterium*, lo que se le atribuye que podría ser efecto de alguna condición ambiental determinada. Por lo que se informaron cambios significativos en la estructura de la comunidad microbiana como resultado de bioinoculación con el consorcio establecido, sin embargo, debe de considerarse que el presente estudio brinda una información preliminar y hasta ahora pionera acerca de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de *S. betaceum*, estimando los filos y géneros de mayor abundancia, su diversidad y monitoreo posterior la inoculación. La información proporcionada podría considerarse como base para el diseño de estrategias de gestión integrada de nutrientes que mejorarían la adquisición de nutrientes del suelo que junto con otros factores (tales como sistema de riego, aplicación de fertilizantes) se pueden establecer estrategias específicas para un cultivo.

Además, como cita la literatura e investigaciones, los bioinoculantes puede suprimir las enfermedades de las plantas y promover la salud de éstas, por lo que no se debe de atribuir su eficiencia a un solo taxón microbiano, dado a que existe la posibilidad de que esté regulado por otros factores ambientales e inclusive algún individuo de la misma comunidad microbiana, o la compleja interacción de varios taxones microbianos presentes en la rizósfera. Por lo tanto, la composición y alteración dinámica microbiana de la rizosfera debe ser continuamente controlada, ya que sus cambios pueden ser interpretados, analizados de diversas formas, estableciendo que en el futuro es necesario realizar análisis a mayor profundidad que impliquen los asociados con taxones microbianos específicos para explorar más a fondo el mecanismo potencial, la seguridad y la estrategia de aplicación de un consorcio de microorganismos para la rizosfera de *S. betaceum*.

Respecto a la persistencia de *Trichoderma spp.*, mediante el desarrollo de un protocolo con condiciones y primers específicos para este género, el análisis de PCR visualizado por electroforesis mediante geles, indicaron que *Trichoderma spp.* no se logró establecer en la rizósfera de *S. betaceum* luego de 120 días durante los cuales el cultivo recibió inoculaciones mensuales con el consorcio microbiano que contenía cepas de dicho género, y como se mencionó previamente se registró ningún cambio en las comunidades de microorganismos del suelo respecto al tratamiento (T-D120). Con base en estos resultados, considerando la complejidad de las relaciones ecológicas entre microorganismos del suelo, el establecimiento de microorganismos benéficos a través de bioinoculantes no puede ser asumida, sino que requiere ser confirmada. Lo que conlleva a que es crucial que previa aplicación de bioinoculantes o microorganismos benéficos para un determinado objetivo, sea esencial conocer la composición microbiana de la rizosfera, identificar los taxones presentes antes de la aplicación, el monitoreo de los microorganismos introducidos es aún un área relativamente poco explorada, serían necesarios más estudios para rastrear la persistencia y supervivencia de estas cepas inoculadas a lo largo del tiempo.

Para finalizar, el presente estudio, principalmente el análisis metagenómico, sería de gran impacto en conjunto con futuras investigaciones incluir la influencia de otros factores como las características edafoclimáticos de la zona donde se produce el cultivo de interés, en este caso de *S. betaceum*, lo que conllevaría a avances biotecnológicos y la comprensión integral de la diversidad genética, dinámica de las comunidades microbianas y un mayor conocimiento de los perfiles microbianos de la rizosfera, in omitir la importancia de medir el impacto de los consorcios microbianos inoculados. Además, se detallan cuáles son los microorganismos de mayor abundancia y posiblemente endófitos, los cuales son esenciales para que puedan usarse como un método para aumentar la resistencia de las plantas hospedantes a las enfermedades y mejorar la salud del suelo.

5. Agradecimientos

Esta investigación fue desarrollada en el marco de un programa de posgrado conjunto VLIR NETWORK-Ecuador

6. Referencias

- Abbott, L., & Murphy, D. (2004). *A key to sustainable land use in agriculture*.
- Acosta-Quezada, P. G., Raigón, M. D., Riofrío-Cuenca, T., García-Martínez, M. D., Plazas, M., Burneo, J. I., Figueroa, J. G., Vilanova, S., & Prohens, J. (2015). Diversity for chemical composition in a collection of different varietal types of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an Andean exotic fruit. *Food chemistry*, *169*, 327-335.
- Acosta-Quezada, P. G., Vilanova, S., Martínez-Laborde, J. B., & Prohens, J. (2012). Genetic diversity and relationships in accessions from different cultivar groups and origins in the tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Euphytica*, *187*(1), 87-97.
- Ahmad, J. S., & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, *77*(2), 182-189.
- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). En N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorsch, F. Ruggeri, & J. L. Teugels (Eds.), *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (1.^a ed., pp. 1-15). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., & Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*, *114*(9), 691-701.
- Barnett, H., & Hunter, B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. *The American Phytopathological Society, 4th ed.*
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, *16*(4), 729-770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil*, *378*(1), 1-33.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, *17*(8), 478-486.
- Blanco, E. M., Little, C. R., & Baines, A. L. D. (2007). Variation in antibiotic inhibitory abilities among streptomycetes from south Texas agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(1), 268-275.
- Bohs, L. (1989). Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Econ. Bot*, *4*, 143-163.
- Bohs, L. (1995). Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*, 583-587.
- Bohs, L. (2001). Revision of *Solanum* section *Cyphomandropsis* (Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 1-85.

- Bonfante, P., & Anca, I.-A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annual review of microbiology*, 63, 363-383.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., van Themaat, E. V. L., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., & Schmelzer, E. (2012). Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91-95.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 265-270.
- Chao, W., Nelson, E., Harman, G., & Hoch, H. C. (1986). Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology*, 76(1), 60-65.
- Cheung, P.-Y., & Kinkle, B. K. (2001). Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2222-2229.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F., & Kapulnik, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum. *Functional Plant Biology*, 28(9), 871-879.
- Falkinham III, J. O. (2009). The biology of environmental mycobacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 477-487.
- Ferreira, F. V., & Musumeci, M. A. (2021). Trichoderma as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 1-17.
- Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 75-91.
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). *Morphology and identification of Trichoderma and Gliocladium*. 3-31.
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). *Morphology and identification of Trichoderma and Gliocladium*. 3-31.
- Geisseler, D., & Scow, K. M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 54-63.
- Gini, C. (1912). Variabilità e mutabilità. *Reprinted in Memorie di metodologica statistica (Ed. Pizetti E.*
- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Charles Munch, J., & Schloter, M. (2007). A new cultivation independent approach to detect and monitor common Trichoderma species in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.12.004>
- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Charles Munch, J., & Schloter, M. (2007). A new cultivation independent approach to detect and monitor common Trichoderma species in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.12.004>
- Hallam, D. (2004). *The market for non-traditional agricultural exports* (Vol. 3). FAO Rome.
- Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (2002). *Trichoderma and gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics* (Vol. 1). CRC Press.

- Hoitink, H., & Boehm, M. (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual review of phytopathology*, 37(1), 427-446.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.
- Huber, K. J., Geppert, A. M., Wanner, G., Fösel, B. U., Wüst, P. K., & Overmann, J. (2016). The first representative of the globally widespread subdivision 6 Acidobacteria, *Vicinamibacter silvestris* gen. Nov., sp. Nov., isolated from subtropical savannah soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 2971-2979.
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R., El-Enshasy, H. A., Dailin, D. J., & Suriani, N. L. (2020). Recent understanding of soil acidobacteria and their ecological significance: A critical review. *Frontiers in Microbiology*, 2712.
- Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. En *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria* (Vol. 5, pp. 3-37). Springer.
- Kibblewhite, M., Ritz, K., & Swift, M. (2008). Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 685-701.
- Kurth, F., Mailänder, S., Bönn, M., Feldhahn, L., Herrmann, S., Große, I., Buscot, F., Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2014). Streptomyces-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 891-900.
- Lahti, L., & Shetty, S. (2012). *Microbiome R package* (1.16.0) [Computer software].
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2018). Drivers of microbial community structure in forest soils. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(10), 4331-4338.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kuniin, V., & Del Rio, T. G. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Bakker, P. A. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Mertz, C., Gancel, A.-L., Gunata, Z., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Vaillant, F., Perez, A. M., Ruales, J., & Brat, P. (2009). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *Journal of food composition and analysis*, 22(5), 381-387.
- Miller, C. D., Hall, K., Liang, Y. N., Nieman, K., Sorensen, D., Issa, B., Anderson, A. J., & Sims, R. C. (2004). Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Mycobacterium Isolates from Soil. *Microbial Ecology*, 48(2), 230-238. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1044-5>
- Motřková, P., & Vytřasová, J. (2012). Comparison of methods for isolating fungal DNA. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(Special Issue), S76-S85. <https://doi.org/10.17221/266/2011-CJFS>

- Oksanen, J., Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). *Vegan: Community Ecology Package* (2.5.7) [Computer software]. <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>
- Orrico, G., Ulloa, S., & Medina, M. (2013). Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* en el control de *Meloidogyne* spp. En plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Revista ciencia*, 15(1), 1390-1117.
- Oyuela Aguilar, M., Gobbi, A., Browne, P. D., Ellegaard-Jensen, L., Hansen, L. H., Semorile, L., & Pistorio, M. (2020). Influence of vintage, geographic location and cultivar on the structure of microbial communities associated with the grapevine rhizosphere in vineyards of San Juan Province, Argentina. *PloS one*, 15(12), e0243848.
- Papavizas, G. (1982). Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology*, 72(1), 121-125.
- Prohens, J., & Nuez, F. (2001). The tamarillo (*Cyphomandra betacea*) a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review*, 1(2), 43-68.
- Prosser, J. I., Rangel-Castro, J. I., & Killham, K. (2006). Studying plant–microbe interactions using stable isotope technologies. *Current opinion in biotechnology*, 17(1), 98-102.
- Qiao, Q., Wang, F., Zhang, J., Chen, Y., Zhang, C., Liu, G., Zhang, H., Ma, C., & Zhang, J. (2017). The variation in the rhizosphere microbiome of cotton with soil type, genotype and developmental stage. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47-e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Samac, D. A., & Kinkel, L. L. (2001). Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant and soil*, 235(1), 35-44.
- Samish, Z., Etinger-Tulczynska, R., & Bick, M. (1961). Microflora within healthy tomatoes. *Applied microbiology*, 9(1), 20-25.
- Sariah, M., Choo, C., Zakaria, H., & Norihan, M. (2005). Quantification and characterisation of *Trichoderma* spp. From different ecosystems. *Mycopathologia*, 159(1), 113-117.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, B., van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand.
- Setälä, H., Berg, M. P., & Jones, T. H. (2005). Trophic structure and functional redundancy in soil communities. *Biological diversity and function in soils*, 236-249.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). A mathematical model of communication. *Urbana, IL: University of Illinois Press*, 11.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *nature*, 163(4148), 688-688.
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3-4), 339-353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>

- Tittonell, P. (2014). Ecological intensification of agriculture—Sustainable by nature. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 8, 53-61.
- Vasco, C., Avila, J., Ruales, J., Svanberg, U., & Kamal-Eldin, A. (2009). Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), 278-288.
- White, C., Birtles, R., Wigley, P., & Jones, P. (2010). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Veterinary Record*, 166(13), 401-402.
- Wiggins, B., & Kinkel, L. (2005). Green manures and crop sequences influence alfalfa root rot and pathogen inhibitory activity among soil-borne streptomycetes. *Plant and Soil*, 268(1), 271-283.
- Wiggins, B., & Kinkel, L. (2005). Green manures and crop sequences influence potato diseases and pathogen inhibitory activity of indigenous streptomycetes. *Phytopathology*, 95(2), 178-185.
- Xiao, K., Kinkel, L. L., & Samac, D. A. (2002). Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23(3), 285-295.

7. Anexos

Anexo 1. Cuantificación de la calidad del gADN extraído de las muestras provenientes de la rizosfera de *S. betaceum*

ID	Qbit (ng/uL)
C-D1 (R1)	16,9
C-D1 (R2)	7,31
C-D1 (R3)	14,2
CT-D1 (R1)	16,5
CT-D1 (R2)	31,3
CT-D1 (R3)	19
C-D120 (R1)	20,2
C-D120 (R2)	52
C-D120 (R3)	28,1
T-D120 (R1)	44,6
T-D120 (R2)	32,7
T-D120 (R3)	50

Anexo 2. Índices de diversidad alfa

	Índices de diversidad alfa			
	Chao1	Shannon	Simpson	Inverse_Simpson
C_D1	726,9886	4,89223	0,98006939	50,17407429
CT_D1	722,4945	5,02362	0,98213461	55,97413904
C_D120	678,8	4,71844	0,96613721	29,53094183
T_D120	695,366	5,14487	0,98459503	64,91411239

Anexo 3. Prueba estadística de Bray-Curtis

	Df	SumOfSqs	R2	F	F Pr(>F)
Condition	1	0.023730	0.31896	1.3994	0.5000
Tiempo_Muestreo	1	0.033710	0.45312	1.9880	0.1667
Residual	1	0.016956	0.22792		
Total	3	0.074396	100.000		

Anexo 4. PERMANOVA

	Df	SumOfSqs	R2	F	F Pr(>F)
Condition	1	0.026206	0.32313	1.0742	0.5000
Tiempo_Muestreo	1	0.030498	0.37605	1.2501	0.1667
Residual	1	0.024397	0.30082		
Total	3	0.081100	100.000		